CRIQ

87-04555/

Le Centre de recherche industrielle du Québec est une société d'Etat dont la mission est de soutenir et stimuler le développement technologique des entreprises manufacturières du Québec.

Le CRIQ travaille donc en étroite collaboration avec les industriels pour les aider à réaliser leurs objectifs en leur offrant des services sur mesure:

- l'information,
- le développement de produits et de procédés de fabrication,
- l'assistance technique,
- l'aide au transfert de technologie.

Le personnel compétent et expérimenté du CRIQ de même que ses laboratoires et ateliers bien équipés tant à Québec qu'à Montréal sont à la disposition de tout industriel soucieux d'innover.

14834

PRETRAITEMENT DU MATERIEL LIGNOCELLULOSIQUE PAR ACTION THERMOMECANIQUE EN PHASE AQUEUSE: CARACTERISATION DES PRODUITS PAR VOIES ENZYMATIQUE ET MICROBIOLOGIQUE

Rapport technique No. MAT-86-041

Dossier CRIQ no. 532-0065

MARS 1986

FC 5665

CLIENT: M.A.S.
No. dossier: 05SR.31025-4-5023
No. contrat: 0SR84-00098

Agent de projet du CNRC
Dr. R.P. Overend
CNRC
Edifice M-55
Ottawa, (Ontario)
K1A OR6

RESPONSABLE TECHNIQUE:

LINE JAULIN, M.Sc.A
Groupe Procédés chimiques

AGENT DE RECHERCHE

DENIS GROLEAU, Ph.D.
Groupe Biotechnologie et alimentation

C.G.:

D.S.:

Sainte-Foy, le 31 mars 1986

CRIQ
CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

RÉSUMÉ

Le but de ce travail est le développement d'une approche fractionnée qui permettra l'utilisation des trois facteurs polymériques majeurs: hémicellulose, cellulose et lignine. Nous proposons une nouvelle technologie développée à l'Université de Sherbrooke.

Dans la première partie de ce rapport nous présentons le procédé de prétraitement du matériel lignocellulosique ainsi que les essais effectués sur trois substrats différents. Le prétraitement du matériel lignocellulosique permet d'obtenir des conversions de 30 à 60% dans le cas de Populus Deltoïdes se traduisant par une solubilisation accrue des hémicelluloses pouvant atteindre 85% à 220°C, 31 MPa et 88 secondes de temps de résidence. Cette solubilisation des hémicelluloses s'accompagne dans les cas extrêmes d'un passage en solution de 50% de la cellulose et 45% de la lignine. A des températures plus faibles (200°C) il est possible de solubiliser sélectivement les hémicelluloses.

Les mêmes observations peuvent être faites pour le peuplier Tremuloïdes. Par contre le prétraitement des tiges de maïs a été plus délicat. Nous avons dû faire face à d'importants problèmes d'abrasion. Les quelques résultats obtenus laissent entrevoir de fortes conversions de l'ordre de 44 à 70% dans la plage de température étudiée (150-220°C) se traduisant par des solubilisations d'hémicelluloses de 70 à 80%.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Dans la deuxième partie de ce rapport nous évaluons la qualité des produits obtenus par hydrolyse enzymatique suivie d'une fermentation. La mesure de l'efficacité du traitement est exprimée en terme d'éthanol produit. L'hydrolyse enzymatique des "hémicelluloses" extraites des divers bois prétraités fut relativement facile et donna des hydrolysats riches en xylose. En général, ces hydrolysats ne furent que partiellement fermentés par la levure Pachysolen tannophilus pour donner des rendements très faibles en éthanol. Nous pensons que la présence d'un ou de plusieurs inhibiteur(s) dans le mélange enzymes + tampon employé dans la préparation des hydrolysats affecta grandement la conversion du xylose en éthanol. Ce dernier point demande d'être reconfirmé. L'hydrolyse enzymatique des résidus (fibres lignocellulosiques), après délignification, fut très acceptable (% d'hydrolyse: 50-60%) et donna des hydrolysats riches en glucose. Un seul de ces quatre hydrolysats se montra réfractaire à la fermentation avec la levure Saccharomyces cerevisiae. En général, les rendements en éthanol varièrent entre 58 et 74% du rendement théorique. Des recommandations ou suggestions sont aussi incluses quant à la poursuite des travaux.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

PARTIE I

DANS CETTE PREMIÈRE PARTIE, LES TRAVAUX SUIVANTS ONT ÉTÉ RÉALISÉS:

1. PRÉTRAITEMENT THERMOMÉCANIQUE EN PHASE AQUEUSE AVEC L'UNITÉ DE DÉVELOPPEMENT DE PROCÉDÉS DU DR. CHORNET A L'UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE POUR TROIS DIFFÉRENTS SUBSTRATS, SOIT:

   . POPULUS DELTOÏDES;
   . POPULUS TREMULOÏDES;
   . TIGES DE MAÏS.

2. DÉPOLYMÉRISATION DES SUBSTRATS EN CELLULOSE, HÉMICELLULOSE ET LIGNINE.

3. BILAN DE MATIÈRE ET D'ÉNERGIE,.

TABLE DES MATIERES

PRETRAITEMENT DU MATERIEL LIGNOCELLULOSIQUE

1.0 INTRODUCTION.....1

2.0 OBJECTIF GENERAL DU PROJET.....2

3.0 STRUCTURE DU BOIS.....4
3.1 Structure.....4
3.2 Composition chimique.....4

4.0 PRETRAITEMENT DU MATERIEL LIGNOCELLULOSIQUE.....6
4.1 Rappels.....6
4.2 Réactions rencontrées lors du prétraitement.....7
4.3 Option retenue pour le prétraitement.....9

5.0 EXPERIMENTATION.....17
5.1 Procédure expérimentale.....17
5.2 Grilles d'expériences.....18

6.0 RESULTATS ET DISCUSSIONS.....21
6.1 Série I : Populus deltoïdes.....21
6.2 Série II : Populus trémuloïdes.....26
6.3 Série III: Tiges de maïs.....27

7.0 CONCLUSIONS.....32

8.0 RECOMMANDATIONS.....34

BIBLIOGRAPHIE.....35

ANNEXE A: Techniques analytiques

ANNEXE B: Caractérisation des substrats lignocellulosiques

ANNEXE C: Résultats expérimentaux

ANNEXE D: Bilans: matière et énergie

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: P.D.U. Fractionnement et hydrolyse (Procédé U de S).

FIGURE 2: Procédure analytique

FIGURE 3: Série I: Conversion vs température

FIGURE 4: Série I: Composition du résidu vs température

FIGURE 5: Série I: Diagramme de Ross

FIGURE 6: Série I: Solubilisation des hémicelluloses vs température

FIGURE 7: Série II: Conversion vs température

FIGURE 8: Série II: Composition du résidu vs température

FIGURE 9: Série II: Diagramme de Ross

FIGURE 10: Série II: Solubilisation des hémicelluloses vs température

CRIQ

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I: Composition des substrats (extraits à l'eau) en holocellulose, cellulose et lignine par analyse thermique

TABLEAU II: Analyse élémentaire

TABLEAU III: Composition des cendres

TABLEAU IV: Degré de polymérisation des substrats

TABLEAU V: Série I, composition des résidus en holocellulose, cellulose et lignine

TABLEAU VI: Série I, composition en sucres des résidus

TABLEAU VII: Série II, composition des résidus en holocellulose, cellulose et lignine

TABLEAU VIII: Série II, composition en sucres des résidus

TABLEAU IX: Série III, composition des résidus en holocellulose, cellulose et lignine

TABLEAU X: Série III, composition en sucres des résidus

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

1.0 INTRODUCTION

Le Centre de recherche industrielle du Québec a depuis plusieurs années mis l'accent sur la recherche en matière de valorisation de la biomasse. C'est dans cet état d'esprit qu'il a associé ses efforts à ceux de l'Université de Sherbrooke depuis deux ans et demi en y déléguant un agent de recherche pour développer un système de prétraitement thermo-mécanique du matériel lignocellulosique en phase aqueuse. Ce système, travaillant à des températures et des pressions élevées, et de courts temps de résidence permet d'atteindre sévèrement les structures fibrillaires du bois et dépolymérise sélectivement les substrats lignocellulosiques.

Dans le cadre du contrat OSR85-00098 du Ministère des Approvisionnements et Services Canada (M.A.S.), le prétraitement a été effectué sur trois substrats. La qualité des produits obtenus fut évaluée en terme de dépolymérisation du matériel lignocellulosique, en terme de production de glucose et xylose après hydrolyse enzymatique respectivement de la fraction solide (riche en cellulose) et de la fraction liquide (riche en hémicellulose) et enfin en terme de production d'éthanol après fermentation des sucres obtenus.

Le prétraitement du matériel lignocellulosique a été réalisé à l'Université de Sherbrooke. La caractérisation des produits par voies enzymatique et microbiologique a été effectuée au CRIQ (Sainte-Foy).

2.0 OBJECTIF GÉNÉRAL DU PROJET

Dans le cadre du contrat OSR84-00098 du MAS, l'objectif principal de ce travail était d'évaluer la qualité des résidus et des filtrats obtenus lors du prétraitement thermo-mécanique en phase aqueuse du matériel lignocellulosique (dans le procédé développé par l'équipe du Professeur E. Chornet à l'Université de Sherbrooke) et de l'hydrolyse enzymatique de ces derniers pour obtenir les sucres.

La fermentescibilité des sucres obtenus était alors vérifiée. La conversion des sucres (glucose dans le cas des résidus et xylose dans le cas des filtrats) en éthanol fut choisie comme critère d'évaluation de la qualité des produits obtenus.

Pour accomplir cet objectif les travaux suivants ont été effectués:

1. Tester le système de prétraitement thermo-mécanique en phase aqueuse développé à l'Université de Sherbrooke pour différents substrats à savoir:
   - populus deltoïdes
   - populus tremuloïdes
   - tiges de maïs

2. Dépolymériser le matériel lignocellulosique en ses trois constituants majeurs à savoir: la cellulose, l'hémicellulose et la lignine;

3. Mise au point du protocole expérimental d'hydrolyse enzymatique des résidus et des filtrats en vue d'obtenir des solutions sucrées. Cette étape comprenait le choix du complexe enzymatique et la détermination des conditions opératoires;

4. Fermenter les sucres obtenus en éthanol (cf. Chap II) et obtenir les rendements;

5. Établir les bilans de matière et d'énergie du procédé de prétraitement;

6. Préparer un rapport final.

Cette première partie des travaux se rapporte plus spécifiquement aux items 1, 2, 5 et 6 ci-haut.

3.0 STRUCTURE DU BOIS

Pourquoi un prétraitement? Pour répondre à cette question, il suffit d'observer la structure du bois en tant que telle.

3.1 Structure

Le bois est constitué en majeure partie de parois cellulaires qui se subdivisent en: paroi primaire P
paroi secondaire S

Dans un bois à maturité les parois primaires de deux cellules voisines sont séparées par une substance intercellulaire: la lamelle mitoyenne (L)

. la paroi primaire : se développe la première puis se modifie pendant la croissance et la différenciation cellulaire;

. la paroi secondaire: elle est formée à l'intérieur de la paroi primaire quand la croissance de la cellule est terminée. Elle est beaucoup plus épaisse que la paroi primaire. Elle se subdivise en 3 sous-couches: S1, S2, S3 de l'intérieur vers l'extérieur, se distinguant par l'orientation des microfibres qui les composent. P, S1 et S3 ont des épaisseurs de 0,1µ à 0,3 µ tandis que S2 est plus épaisse: 1,5µ.

3.2 Composition chimique

La composition chimique typique du bois est la suivante:

- la_paroi_tertiaire_S3: très fine (0,1 µm) est composée de cellulose pratiquement pure et est très stable chimiquement;

- la_paroi_secondaire (1 à 10 µm): contient l'essentiel de la cellulose du bois. Cette cellulose est agrégée en microfibrilles imbriquées avec des hémicelluloses amorphes et de la lignine.

- la_paroi_primaire: dont l'épaisseur est de 0,1 µm, a une composition voisine de la précédente.

- la_lamelle_moyenne de 1 à 2µm d'épaisseur contient beaucoup de lignine (70% de lignine et 30% d'hydrate de carbone). C'est une structure rigide, véritable squelette de la fibre et donc du bois.

A la lueur de ces informations nous constatons que pour aller chercher les trois constituants majeurs du bois à savoir la cellulose, les hémicelluloses et la lignine un prétraitement sera nécessaire.

Le prétraitement aura donc pour objectif d'induire des changements structuraux, de fractionner le matériel lignocellulosique, afin de libérer les trois constituants majeurs et finalement les dépolymériser.

4.0 PRÉTRAITEMENT DU MATÉRIEL LIGNOCELLULOSIQUE

4.1 Rappels

Conventionnellement, le prétraitement du matériel lignocellulosique est effectué par une approche explosive (Procédé "Mason" Réf. Mason 1928) ou par cisaillement à l'aide de systèmes d'extrusion (dérivés du Procédé ASPLUND Réf. ASPLUND).

Pour attaquer de façon efficace la fibre du bois un traitement thermo-mécanique appelé décompression explosive a été développé et est connu sous le nom de procédé "Masonite".

Dans le procédé Masonite le bois est défibré par une détente explosive (steam explosion) obtenu par un échauffement rapide à haute pression (jusqu'à 70 bars) après un traitement à la vapeur des copeaux dans un digesteur ou "mason gun" à des températures aussi élevées que 285° C et des temps de résidence de l'ordre de quelques secondes.

Au Canada, deux compagnies oeuvrent dans le domaine du prétraitement. Le premier connu sous le nom de procédé Iotech fut développé par T. Delong (Brevet 1981). C'est un système batch dans lequel la biomasse est chauffée (210-240° C) à une pression comprise entre 540 et 740 psi. Le temps de résidence du matériel est de 20 à 80 secondes. Après ce court temps de résidence, le matériel est déchargé à pression atmosphérique. L'hydrolyse enzymatique du bois explosé montre qu'environ 50% du bois initial est converti en produits solubles en 24 heures.

Le deuxième système, commercialisé par Stake Technology est un système d'autohydrolyse en continu développé par R. Bender (Brevet 1979). Le procédé consiste en la formation d'un bouchon de copeaux de bois présentant une humidité de 50%. Le bouchon est transféré par l'intermédiaire d'une vis dans un long digesteur horizontal maintenu à la pression de vapeur saturée grâce à une bouilloire. Les conditions d'opérations sont les suivantes:

Température : 200-210°C
Pression : 210-250 psi
Temps de résidence: 5-20 minutes

L'hydrolyse enzymatique du bois explosé "Stake" montre une conversion de 40% en 24 heures et 90% en 12 jours. La plus grande accessibilité aux enzymes du bois explosé comparée à celle du bois autohydrolysé est attribuée au fait que la structure du bois et le réseau microfibrillaire sont atteints par un tel traitement.

4.2 Réactions rencontrées lors du prétraitement

Lors d'un prétraitement thermo-mécanique à la vapeur comme c'est le cas du procédé U de S, plusieurs réactions surviennent. Une première catégorie de type mécanique est observée lors du passage de la solution au travers un orifice ou vanne d'homogénéisation ayant à ses bornes une différence de pression élevée (1000 à 5500 psi). Les particules soumises à un tel traitement voient leur structure fortement désorganisée; si on ajoute à ce traitement de fortes températures, d'autres changements plus profonds apparaissent. Durant une exposition à de fortes températures

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

les groupements acétyls des hémicelluloses sont hydrolysées et libèrent de l'acide acétique (Aronosky et Gortner). D'autres acides organiques sont formés en plus faible quantité. De la même façon, la formation de méthanol à partir des groupements méthoxy des hémicelluloses peut être observé lors d'un prétraitement à la vapeur.

De même, on observe une réduction de la taille des particules et une séparation des trois constituants du complexe lignine - hémicellulose - cellulose permettant d'accroître l'accessibilité de la cellulose aux agents hydrolytiques.

Quand la réaction d'autohydrolyse a lieu à des températures plus élevées et des temps de réaction plus longs, la solubilisation des carbohydrates s'accompagne d'une série de réactions secondaires, incluant des réarrangements et une déhydration pour former du furfural et du 5-hydroxy - méthyl furfural. Ces composés peuvent être impliqués dans des réactions d'autocondensation pour former des polymères ou peuvent réagir avec la lignine et former des copolymères.

Bien que l'hydrolyse des hémicelluloses soit une des réactions importantes durant l'autohydrolyse, il a été observé que la lignine dans certains bois durs peut être considérablement dégradée et modifiée durant ces réactions d'hydrolyse. Aronovsky et Gortner ont montré il y a plus de 40 ans que 45% de la lignine présente dans le peuplier Trémuloides était soluble dans l'éthanol - benzène quand on l'autohydrolysait à 185° C pendant 4 heures.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Plus récemment, Lora et Waman ont montré que des changements structuraux importants survenaient dans les molécules de lignine lors de l'autohydrolyse de bois durs. Ils trouvèrent qu'après autohydrolyse du peuplier et de l'eucalyptus à 175° C - 220° C, 60-92% de la lignine devenait soluble dans l'eau-dioxane ou une base diluée.

4.3 Option retenue pour le prétraitement

Une alternative aux précédentes approches est le procédé U de S dans lequel le matériel lignocellulosique se trouve en suspension dans l'eau à des concentrations pouvant atteindre 18%. La suspension est chauffée instantanément par injection de vapeur puis passe au travers une vanne d'homogénéisation pour forcer les changements structuraux. La pression d'opération peut être aussi élevée que 35 MPa. Après un court temps de résidence de l'ordre de quelques secondes le matériel est déchargé à pression atmosphérique.

Plus précisément le système se compose de 4 modules:

. un module de concentration de la suspension (photo 1)
. un module d'injection de vapeur (photo 2)
. un module de cisaillement
. un module de réaction secondaire. (photo 3)

- un module de concentration de la suspension: où par recirculation à travers une vanne de cisaillement, on facilite l'homogénéisation de la suspension aqueuse et une certaine défibrillation. A ce niveau, la différence de pressions appliquées aux bornes de la vanne d'homogénéisation est de 5,5 MPa.

  Ce système permet des additions successives de bois préalablement broyé (0,5 mm). Des suspensions ayant 16 à 20% de matières lignocellulosiques peuvent être pompées. Dans le cadre de ce travail les suspensions pompées avaient une concentration de 10 à 12% en matières lignocellulosiques.

- un module d'injection de vapeur: où la suspension est rapidement chauffée par injection de vapeur saturée ou légèrement surchauffée provenant d'une bouilloire.

- un module de cisaillement: où la suspension déjà chauffée est rapidement pompée à une plus haute pression (environ 41 MPa pour quelques secondes). Une détente contrôlée par un orifice (ou vanne d'homogénéisation) implique alors des changements structuraux majeurs aux matières lignocellulosiques.

- un module de réaction secondaire: où les matières lignocellulosiques déjà défibrillées restent confinées pendant 88 secondes à 180-220° C et 3,4 MPa de façon à permettre aux différentes réactions chimiques et/ou solubilisations visées d'avoir lieu. Le réacteur est du type à écoulement piston.

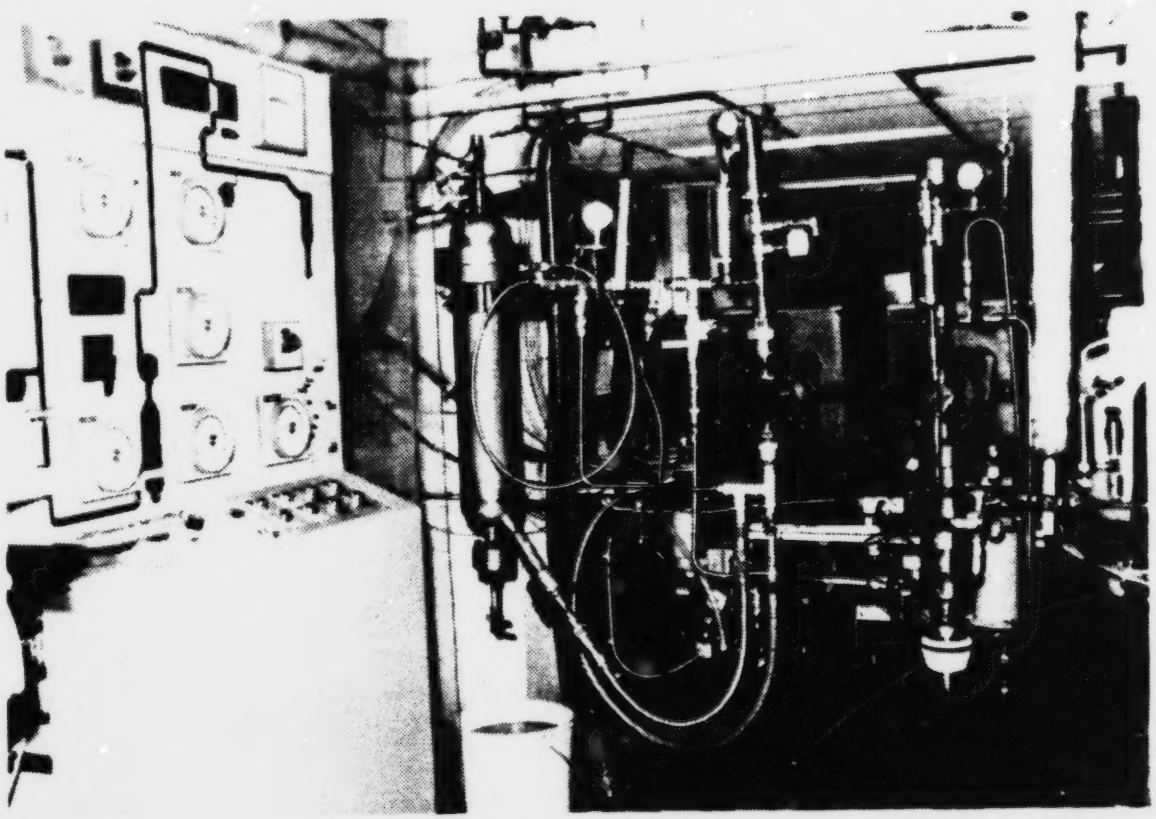


PHOTO 1: Unité de fractionnement

CRIQ

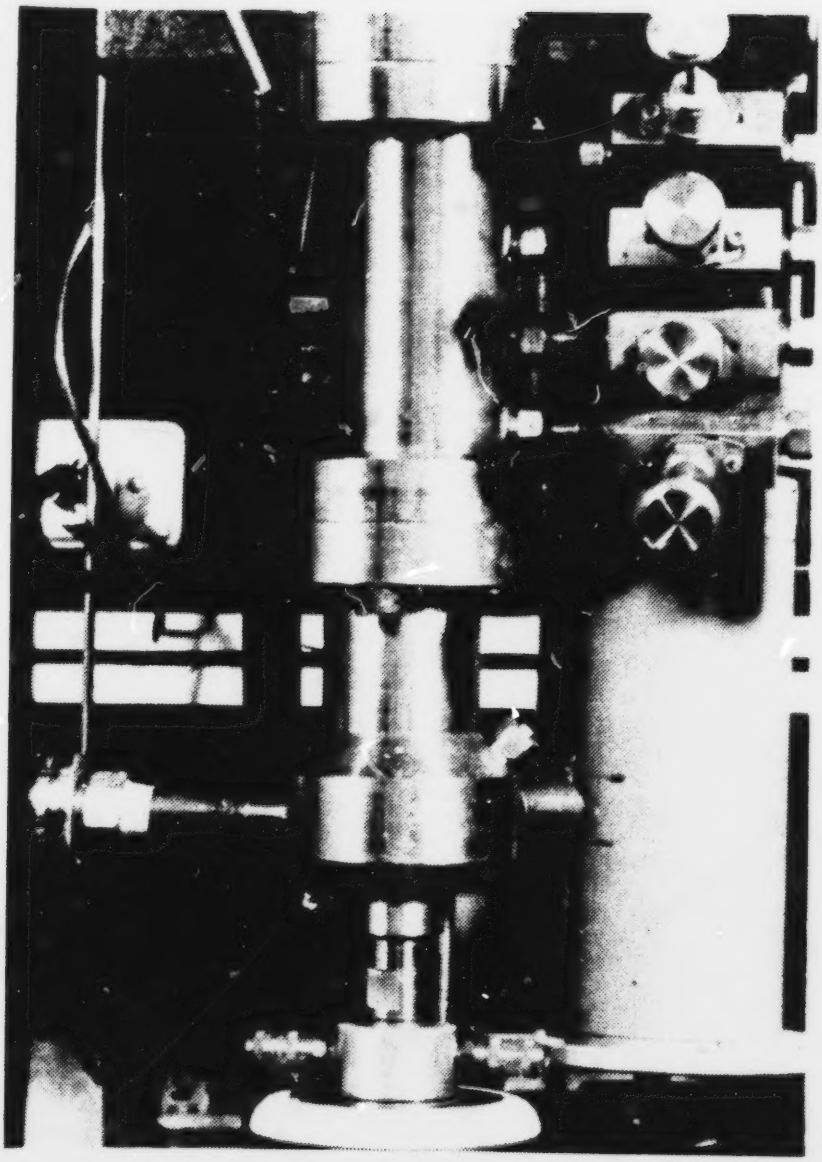


PHOTO 2: Module d'injection de vapeur

CRIQ

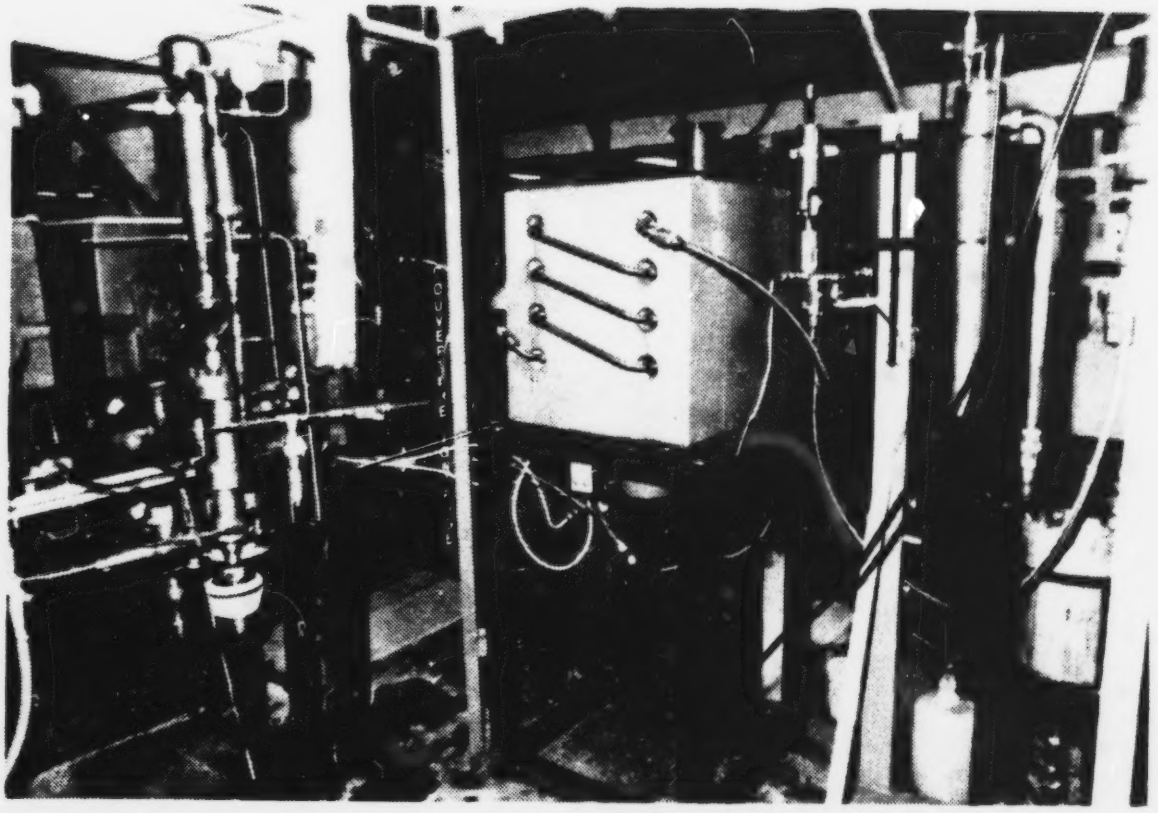


PHOTO 3: Réacteur secondaire et système de récupération des produits.

CRIQ

A la suite du réacteur secondaire, se trouve tout le système de récupération des produits. L'obtention sélective des produits est réalisée par filtration ou centrifugation. Nous obtenons ainsi:

a) un filtrat contenant une grande partie des hémicelluloses (selon le prétraitement considéré) et une partie de la lignine qui est passée en solution;

b) un gâteau qui se compose essentiellement de cellulose et le reste de la lignine qui n'a pas été attaquée par le prétraitement.

Chaque phase sera analysée séparément de façon à déterminer sa composition en sucres. (Figure 2)

L'unité de développement construite à Sherbrooke a les caractéristiques suivantes:

. % de solides dans l'alimentation	: 12 à 20%
. dimensions caractéristiques des solides	: 0,5 mm
. débit de recirculation	: 10 L/min
. DP d'homogénéisation	: 6,5 MPa
. débit d'alimentation à la section de traitement thermo-mécano-chimique	: 0,5-1,0L/min
. DP de défibrillation	: 20-40 MPa
. température de la zone de décompression	: 150-240°C
. temps de résidence après la décompression	: 5-100 sec

Le diagramme d'écoulement de l'unité de développement du procédé est illustré à la Figure 1.

CRIQ

FIGURE 1

P.D.U. FRACTIONNEMENT ET HYDROLYSE (Procédé U de S)

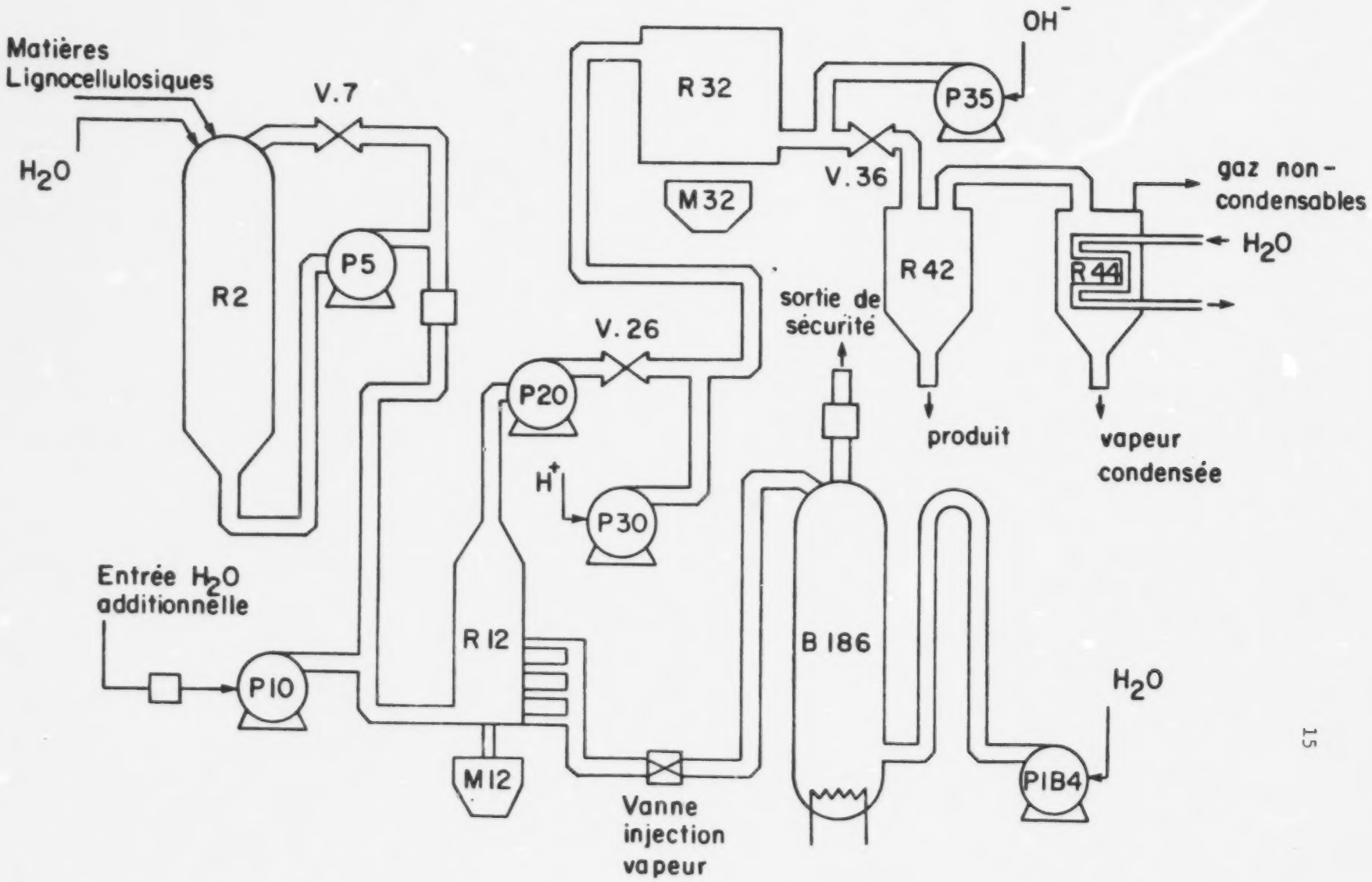
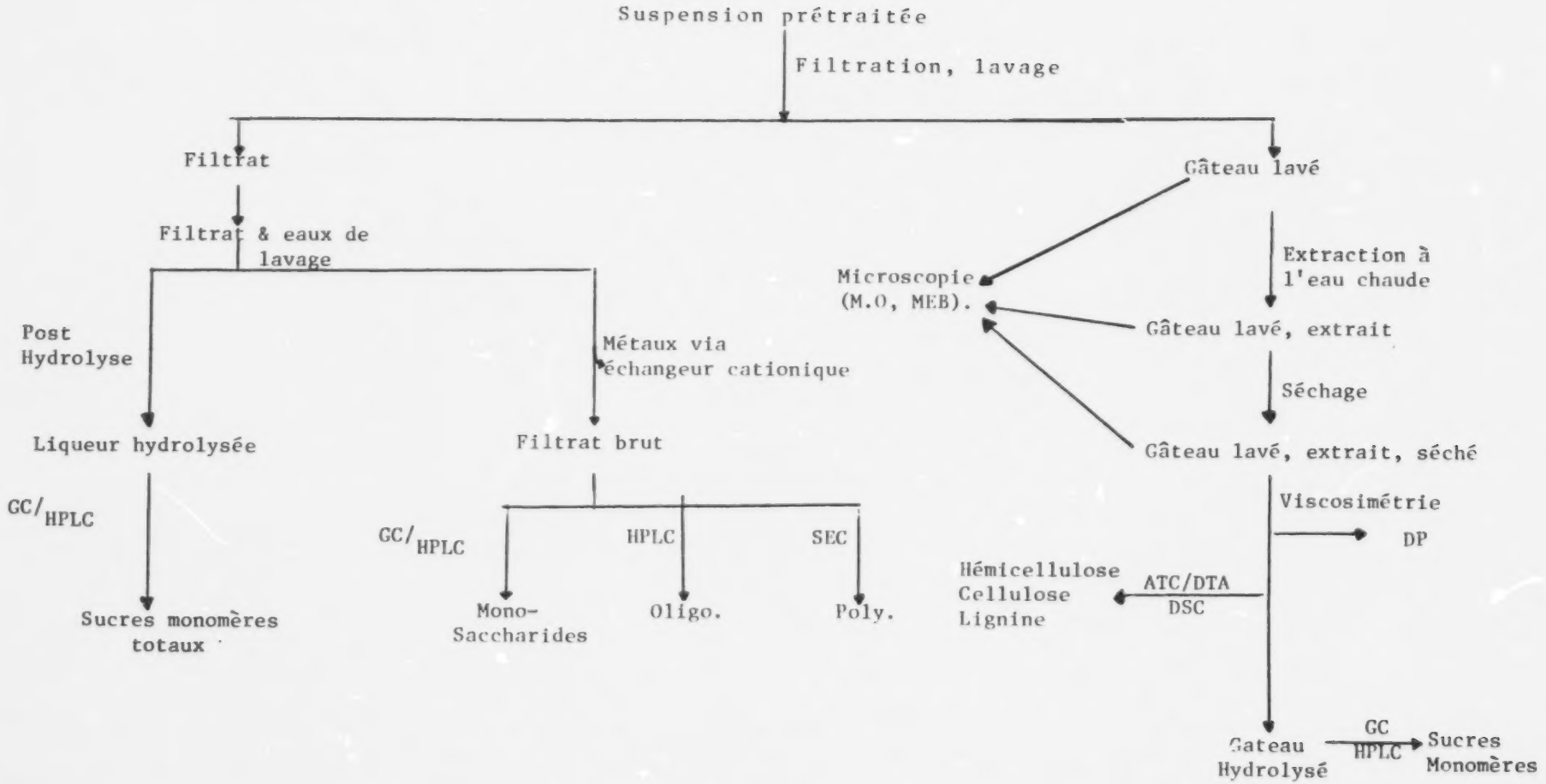


FIGURE 2
PROCEDURE ANALYTIQUE



5.0 EXPÉRIMENTATION

5.1 Procédure expérimentale

Une expérience type comprend les étapes suivantes:

1. raffinage de la biomasse à des dimensions de l'ordre de 0,5 mm;

2. traitement thermomécanique en phase aqueuse consistant en une recirculation via une vanne d'homogénéisation avec addition progressive de solides jusqu'à atteindre des consistances de pâte de l'ordre de 20% en solides;

3. injection de vapeur saturée afin de chauffer rapidement la suspension à 220° C;

4. pompage de la suspension chauffée et décharge soudaine à travers une vanne d'homogénéisation sous l'effet d'un DP compris ente 20-40 MPa;

5. un temps de résidence de 20-100 sec. dans un réacteur tubulaire;

6. une décompression finale sous un P compris entre 3-5MPa;

7. une filtration de la solution traitée permettant de recueillir: un filtrat riche en dérivés hémicellulosiques et en une partie de la lignine présente initialement dans la lamelle intermédiaire, et un résidu composé essentiellement de cellulose microfibrillaire et de lignine;

8. Chaque fraction sera analysée selon le protocole analytique présenté à la Figure 2. Les techniques analytiques utilisées sont décrites en annexe;

Le choix des conditions opératoires est fonction des produits qu'on désire obtenir, à savoir: travailler vers une conversion maximale du substrat en produits solubles, ce qui provoque une forte dégradation de sucres en acides, ou maintenir de faibles conversions afin de favoriser un rendement supérieur en sucres.

5.2 Grille d'expérience

Trois séries de tests ont été menées dans le cadre de ce projet.

Série I: Essais avec Populus Deltoïdes.

Les conditions expérimentales des différents tests effectués avec ce substrat sont rassemblés dans le tableau ci-après.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

EXPÉRIENCE	TEMPÉRATURE °C	PRESSION (MPa)	TEMPS DE RÉSIDENCE (s)
FPD-46	220	31	88
FPD-47	220	37	88
FPD-50	220	36	88
FPD-51	180	31	88
FPD-53	200	31	88

Une expérience type se déroulait de la façon suivante: une solution à 12% (p/v) de particules de bois (0,5 mm) était pompée dans le système de recirculation durant 10 minutes, ce qui correspondait à dix (10) passages de la solution à travers la vanne d'homogénéisation à une pression de 5,5 MPa. Une fois la solution homogénéisée, elle était dérivée vers le module d'injection de vapeur où elle était chauffée

CRIQ

à la température désirée en quelques secondes. Elle subissait ensuite un traitement mécanique par passage au travers d'une deuxième vanne d'homogénéisation présentant à ses bornes des différences de pression aussi élevées que 37,9 MPa (5500 psi). Un tel traitement permet d'atteindre les structures fines du bois; une importante désorganisation du réseau fibrillaire est observée selon les conditions utilisées. On parle à ce stade-ci de bois défibrillé.

La suspension est déchargée dans le réacteur secondaire à une pression de 3,4 MPa et est maintenue pendant quelques secondes (typiquement 88 secondes) à la température désirée. Après ce laps de temps la solution subit une décharge à pression atmosphérique, la suspension est récupérée, filtrée et/ou centrifugée puis analysée. Les résultats d'analyses obtenus sont présentés en annexe au Tableau VI.

Série II: cette série de tests a été réalisée avec un feuillu communément rencontré dans les forêts estriennes, à savoir Populus Tremuloïdes.

La grille d'expérience suivie a été la suivante.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

EXPÉRIENCE	TEMPÉRATURE °C	PRESSION (MPa)	TEMPS DE RÉSIDENCE (s)
FPT-01	177	23	88
FPT-07	180	34	88
FPT-06	193	35	88
FPT-02	200	35	88
FPT-04	217	34	88
FPT-05	220	35	88
FPT-03	220	35,5	88

CRIQ

Le protocole analytique suivi pour cette série de tests est identique a celui cité plus haut (réf. protocole expérimental, série I). Les résultats sont présentés au Tableau VII.

Série III: Pour cette série de tests, le substrat retenu était un résidu agricole local: la tige de maïs. Ce résidu fut obtenu en septembre 1984 auprès d'un cultivateur de la région.

La grille d'expérience était la suivante.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

EXPÉRIENCE	TEMPÉRATURE °C	PRESSION (MPa)	TEMPS DE RÉSIDENCE (s)
FTM-3	180	30 (29,8)	88
FTM-4	200	31 (30,8)	88
FTM-5	220	30 (30,5)	88
FTM-6	180	30 (30,2)	88
FTM-7	150	32,5	88

Pour cette série de tests, il fut nécessaire de changer la configuration de la deuxième vanne d'homogénéisation pour faire face aux importants problèmes d'abrasion relevés. Ce nouveau "design" de la vanne d'homogénéisation a permis de régler partiellement ce problème. En effet, la durée de vie de la vanne a été augmentée mais il fallait remachiner le pointeau de cette dernière après chaque expérience.

Ce phénomène d'abrasion se traduisait en cours d'expérience par une chute importante de la pression. Ces problèmes d'abrasion sont dus vraisemblablement au contenu en silice des tiges de maïs d'une part, et d'autre part à l'éventuelle terre qui se serait retrouvée avec les tiges de maïs durant la récolte de ces dernières. Les résultats sont présentés au Tableau VIII.

CRIQ

6.0 RÉSULTATS ET DISCUSSION

6.1 Série I: Populus Deltoïdes

Une conversion d'environ 48% est observée lors du prétraitement thermomécanique d'une solution de bois à 12% (P/V) à 220° C, 31 MPa de différentiel de pression et 88 secondes de temps de résidence. Le profil de conversion est présenté à la Figure 3. On constate qu'à 220° C, 50% de l'holocellulose a été solubilisée; 85% des hémicelluloses et 31% de la cellulose initialement présentes dans le bois sont donc passées en solution. La lignine quand à elle a été solubilisée à 40%. Dans ces conditions, nous observons que la fibre de bois a été sévèrement atteinte et la sélectivité escomptée par ce prétraitement devient critique au-delà d'une certaine température (220° C) pour un temps de résidence de 88 secondes. Une avenue intéressante serait d'effectuer le même prétraitement à 220° C mais avec des temps de résidence plus courts de l'ordre de 20 secondes, pour augmenter la sélectivité. Dans la grille d'expérience que nous avons suivie, on constate, que si l'on augmente la sévérité en augmentant le différentiel de pression, on obtient une solubilisation encore plus accrue de la cellulose (50%) et des hémicelluloses (87%). Un meilleur prétraitement serait de diminuer de façon importante l'attaque de la cellulose; ceci pourrait éventuellement être réalisé par une diminution du temps de résidence aux fortes températures de réaction.

A la Figure 4, est représenté le changement de compositions du résidu en terme d'holocellulose, de

FIGURE 3: SERIE 1: POPULUS DELTOIDES

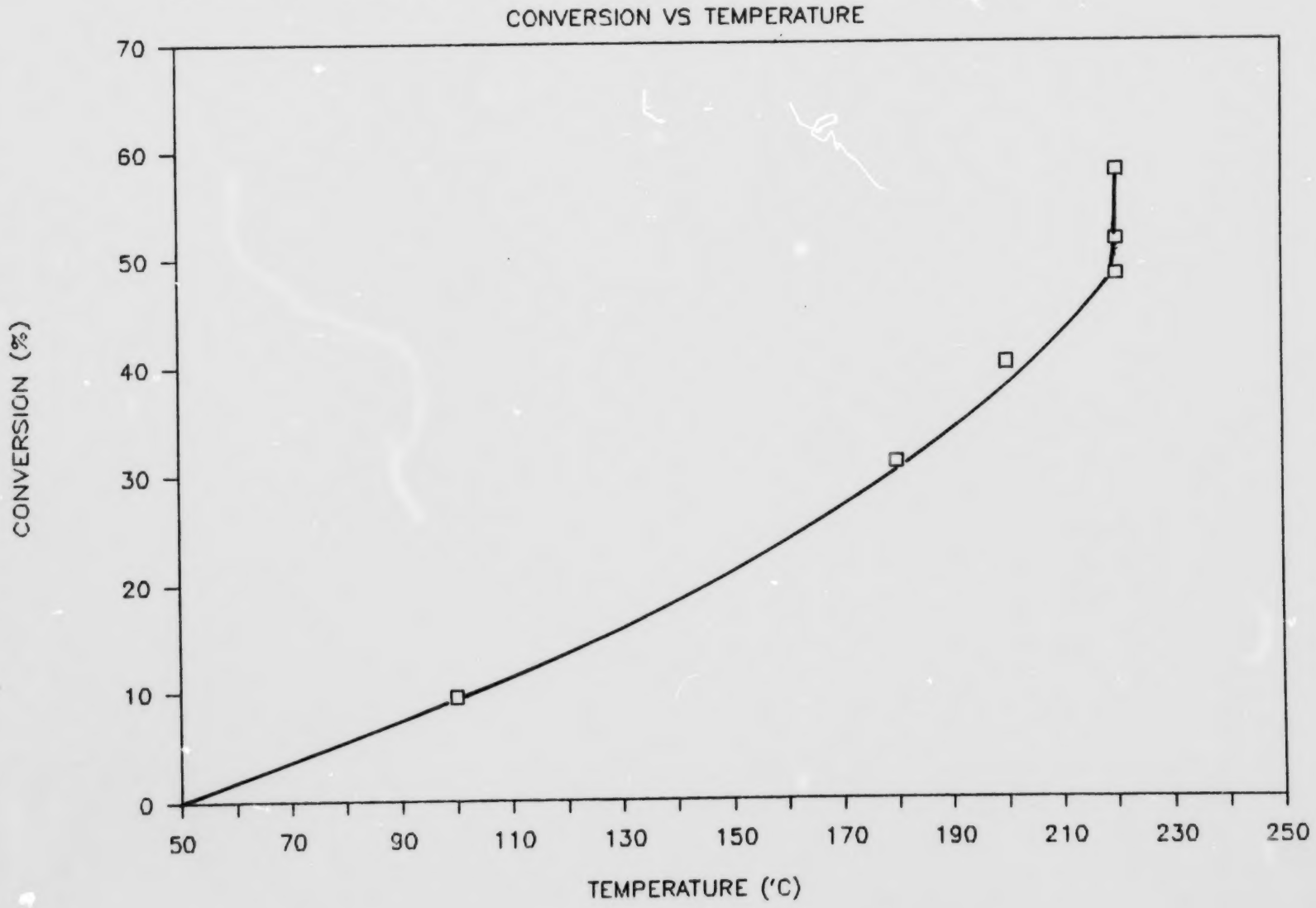


FIGURE 4: SERIE 1: POPULUS DELTOIDES

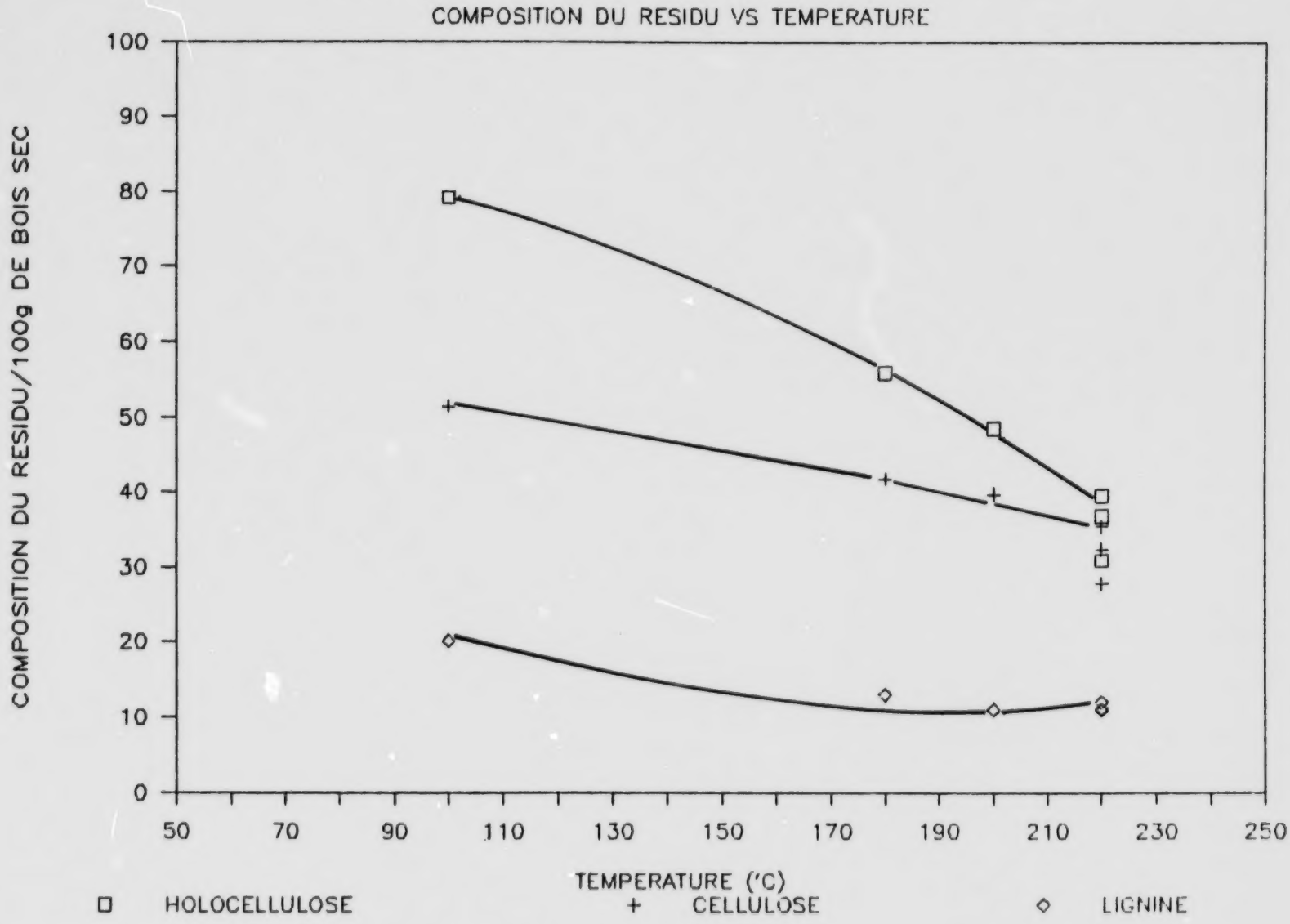


FIGURE 5: SERIE 1: POPULUS DELTOIDES

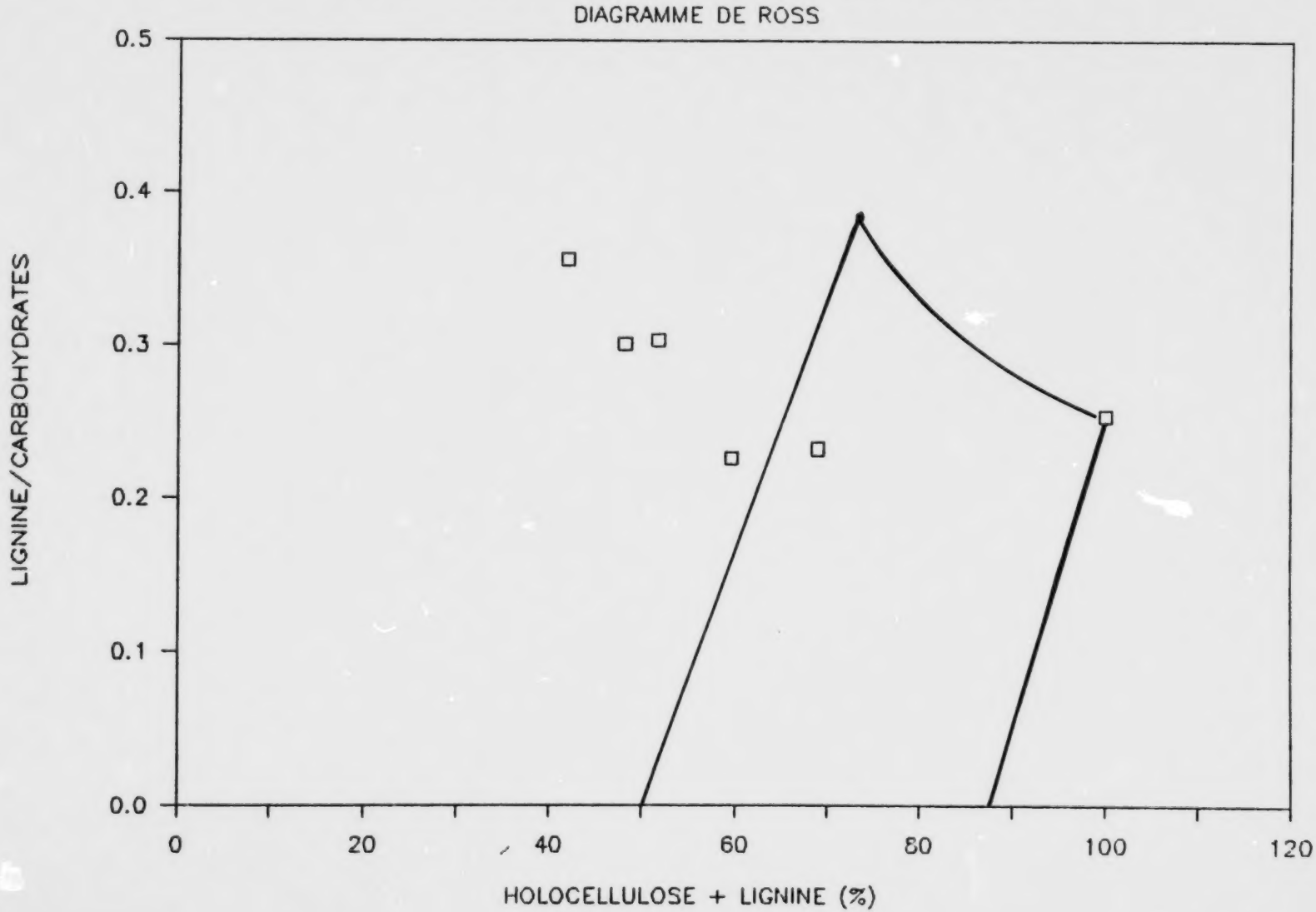
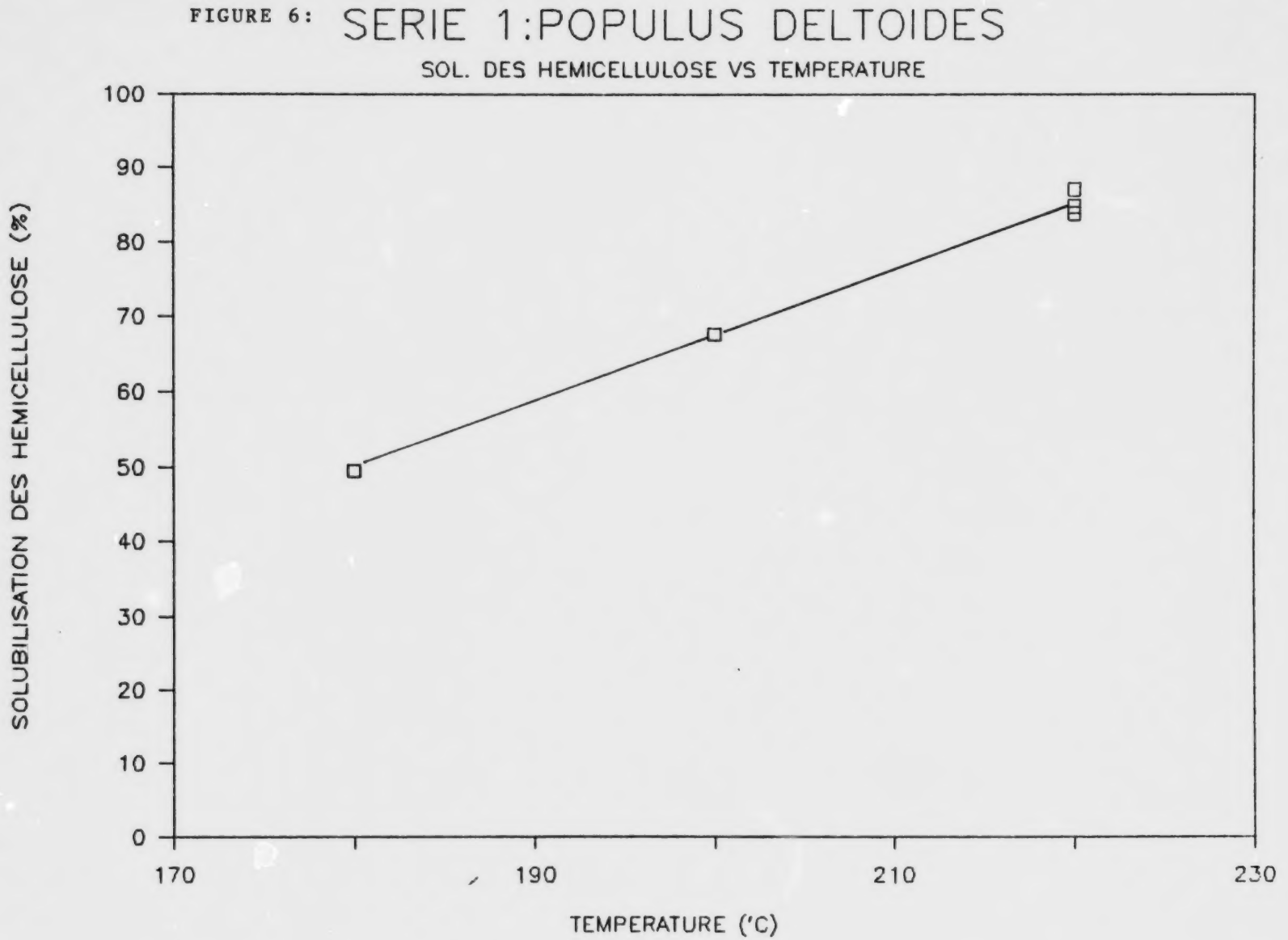


FIGURE 6:


SERIE 1:POPULUS DELTOIDES
SOL. DES HEMICELLULOSE VS TEMPERATURE
SOLUBILISATION DES HEMICELLULOSE (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
170
190
210
230
TEMPERATURE ('C)

cellulose et de lignine, en fonction de la température (les hémicelluloses étant obtenues par différence entre l'holocellulose et la cellulose). La détermination des trois composants du résidu a été faite par analyse thermique. Les détails de cette analyse ont été présentés par J. Bouchard et Al. (1985). On constate un enrichissement du résidu en cellulose et par voie de conséquence une solubilisation sélective des hémicelluloses jusqu'à 200° C; au-delà de cette température une partie importante (plus grande ou égale à 40%) de la cellulose se retrouve dans la fraction liquide. La Figure 5 met en évidence le caractère sélectif du prétraitement sur le diagramme de Ross (STRAPP. (1956)). On remarque qu'aux plus faibles conversions le premier constituant attaqué est la lignine; puis les hémicelluloses passent en solution et, pour des conditions plus sévères, la cellulose est à son tour attaquée.

La Figure 6 présente la solubilisation des hémicelluloses en fonction de la température.

6.2 Série II: Populus Tremuloïdes

Une conversion de 39% est observée lors du prétraitement d'une solution de bois concentrée (12%P/V) à 220° C, 35,5 MPa de différentiel de pression lors de la décharge et 88 secondes de temps de résidence.

Le profil de conversion en fonction de la température est représenté à la Figure 7. On remarque une allure générale de la courbe sensiblement identique à celle observée dans le cas du peuplier Deltoïdes. 39% de

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

conversion se traduit par une solubilisation de 38% de l'holocellulose présente dans le bois initial soit: 26% de la cellulose initiale et 75% d'hémicellulose; la lignine solubilisée représente 42% de celle présente dans la fibre initialement.

A la Figure 8, est représentée l'évolution de la composition du résidu en termes d'holocellulose, de cellulose et de lignine lors du prétraitement. La solubilisation des hémicelluloses jusqu'à 200° C semble plus lente que dans le cas précédent de la Série I. Audelà de cette température, la presque totalité de la fraction hémicellulosique se trouve dans le filtrat (Figure 10). A la Figure 9, le diagramme de Ross présente la sélectivité du prétraitement. On remarque que la fraction lignine qui passe en solution est inférieure à celle observée dans le cas du peuplier Deltoïdes.

6.3 Série III: Tiges de maïs

Les résultats obtenus avec ce substrat ne peuvent pas être exploités. Les tiges de maïs ont eu un comportement aléatoire lors du prétraitement. La forte teneur en matières organiques a interféré de façon importante lors des essais de prétraitement. Une usure de la vanne de cisaillement a été observée à chaque essai.

L'hétérogénéité du substrat de départ semble être une des causes principales du problème. On a détecté notamment la présence de limaille de fer dans le substrat de départ qui aurait pu contaminer les tiges de maïs lors de la mise en poudre dans le moulin Buss Condux. Les résultats obtenus se retrouvent à l'Annexe C.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

FIGURE 7: SERIE 2: POPULUS TREMULOIDES

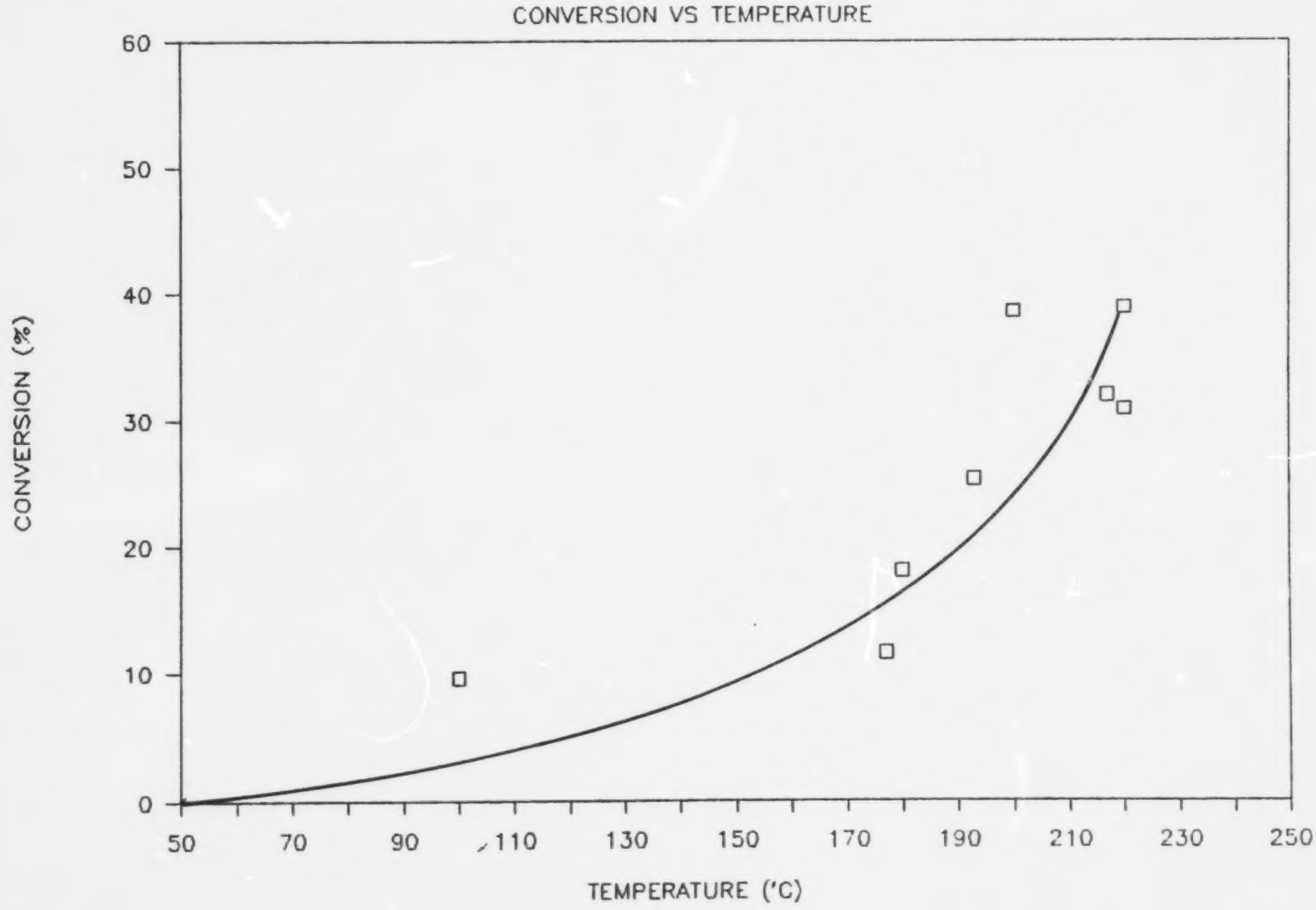


FIGURE 8: SERIE 2: POPULUS TREMULOIDES

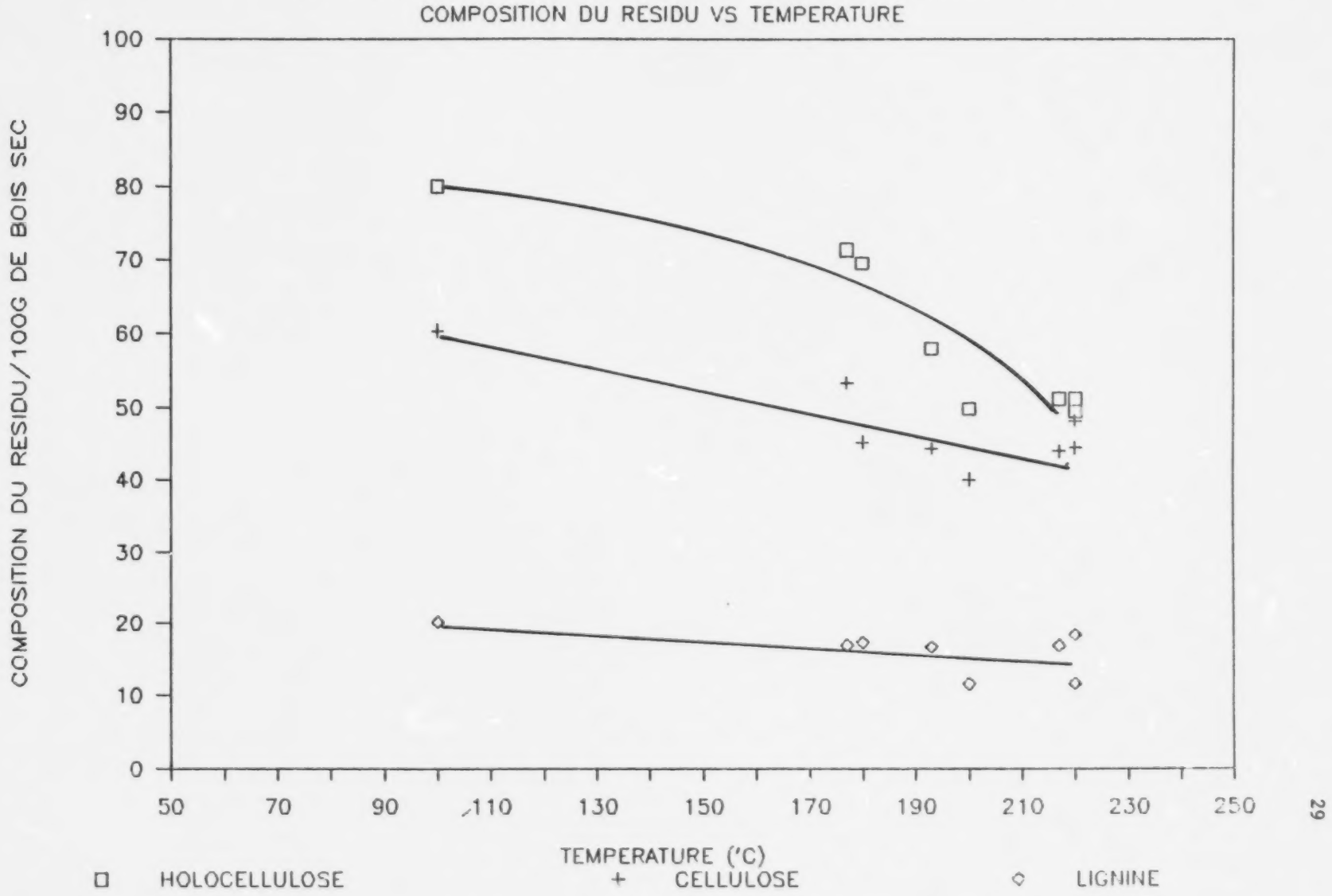


FIGURE 9: SERIE 2: POPULUS TREMULOIDES

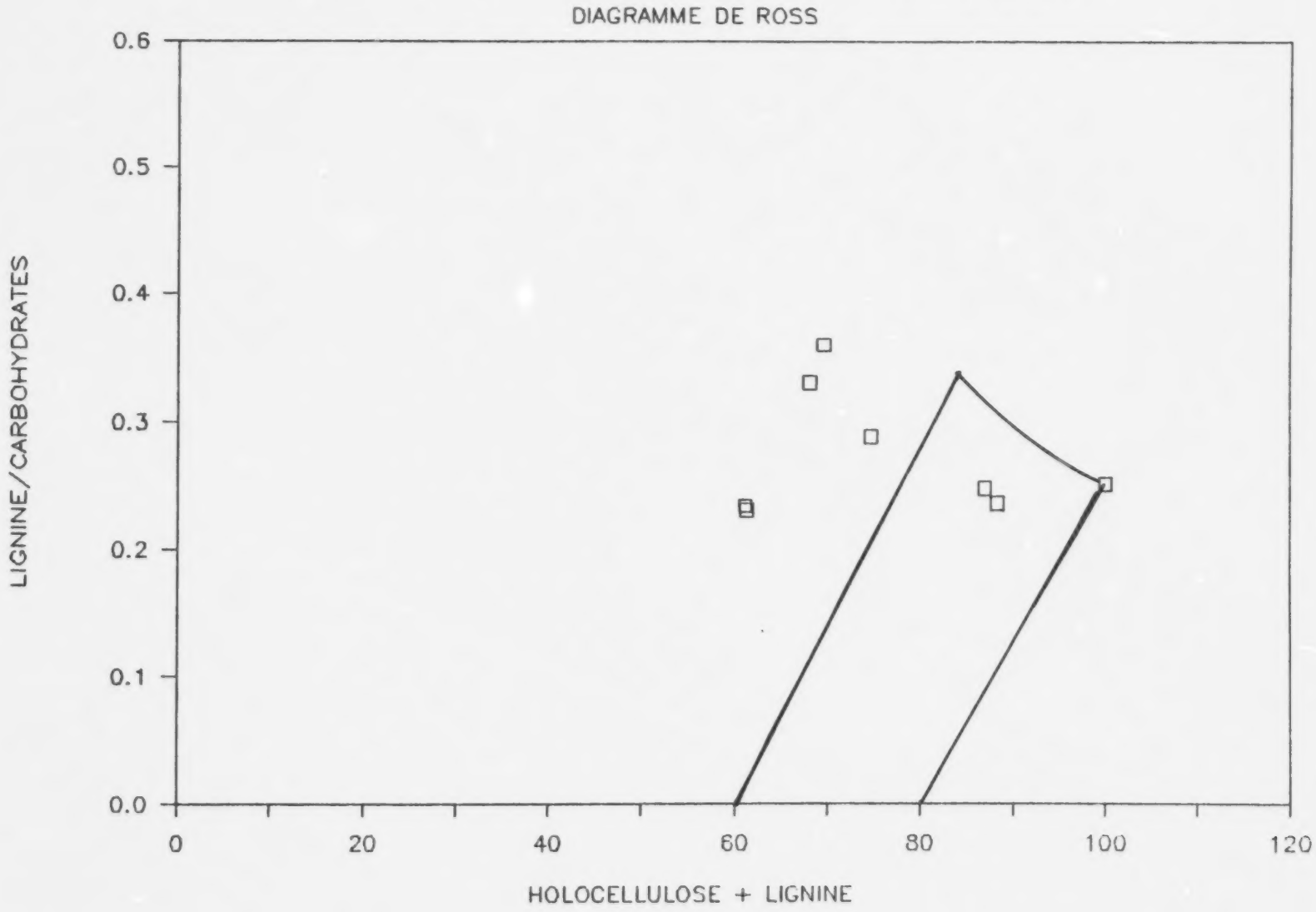
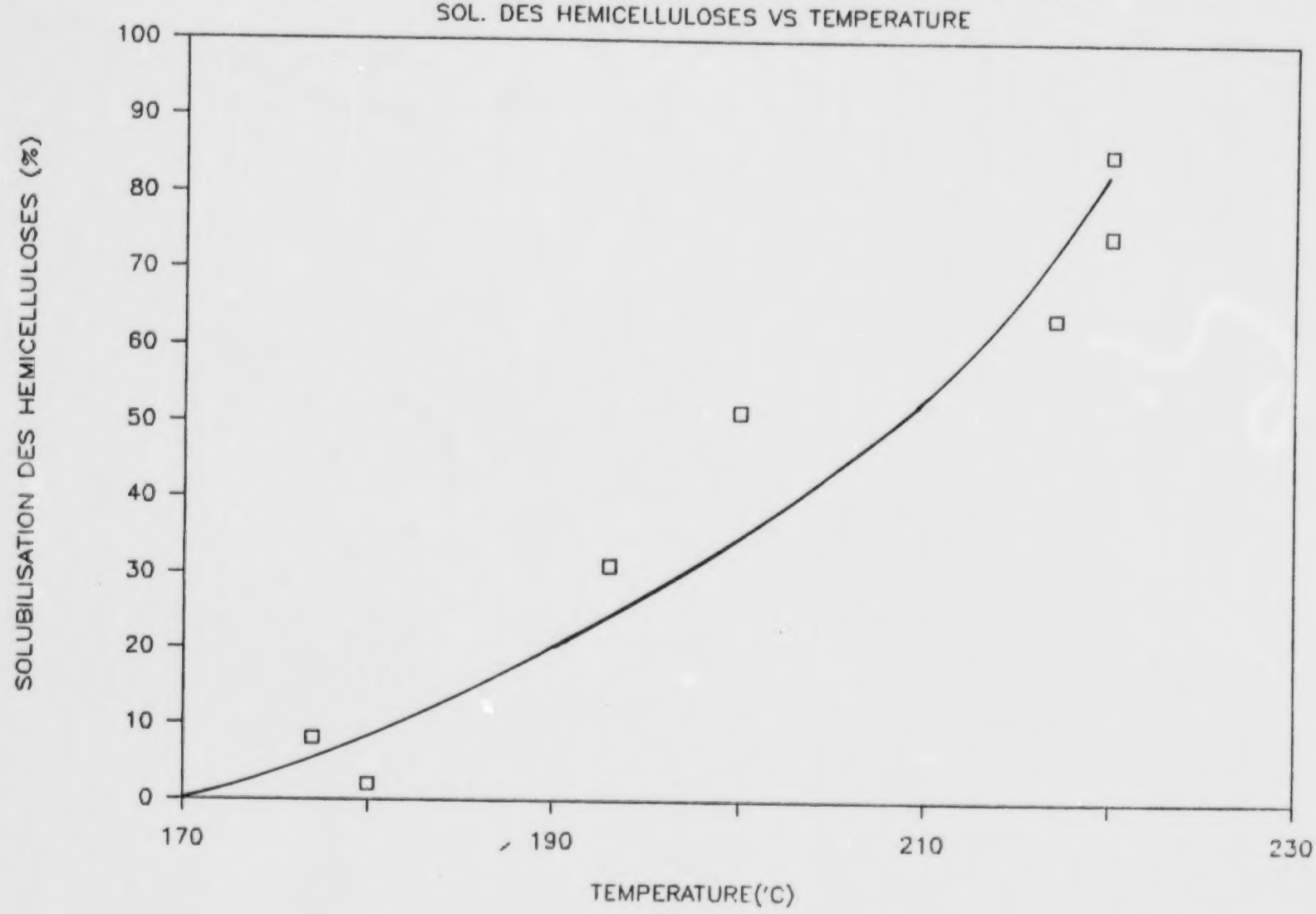


FIGURE 10: SERIE 2: POPULUS TREMULOIDES



7.0 CONCLUSIONS

Le matériel lignocellulosique, par un prétraitement thermomécanique approprié, a été dégradé de façon sélective en trois constituants majeurs à savoir: la cellulose, l'hémicellulose et la lignine.

L'unité de fractionnement développé à l'Université de Sherbrooke par l'équipe du Professeur E. Chronet permet d'atteindre sélectivement les structures du matériel lignocellulosique.

Dans le cas du peuplier Deltoïdes une conversion de 58% est observée lorsque l'on traite la solution du bois à 220°C, 37 MPa et 88 secondes. Cette forte conversion se traduit par une solubilisation presque totale des hémicelluloses (87%) s'accompagnant d'une solubilisation de 50% de la cellulose et 45% de la lignine. On en arrive donc à la conclusion suivante: pour obtenir une plus grande sélectivité, à savoir solubiliser les hémicelluloses préférentiellement sans atteindre la cellulose, un temps de résidence beaucoup plus court serait nécessaire.

La même observation peut être formulée dans le cas du peuplier Tremuloïdes. En effet des tendances similaires ont été relevées, soit une conversion de 39% pour un prétraitement à 220°C, 355 MPa et 88 secondes se traduisant par une solubilisation de 75% d'hémicellulose, de 26% de cellulose et 8% de lignine.

Une tendance similaire peut se dégager des résultats obtenus pour le prétraitement des tiges de maïs.

CRIQ

L'interprétation reste toutefois délicate étant donné le caractère aléatoire des valeurs obtenues. La solubilisation semble être encore plus importante que dans les deux cas précédents. Pour ce dernier substrat, il semblerait que la plage de température retenue (150°-220° C) soit trop élevée, entrainant une solubilisation trop importante des trois composés polymériques.

Le bilan de matière (annexe D) établi pour le peuplier Deltoïdes pour un prétraitement à 220°C nous montre que 100 g de bois peuvent être convertis pour donner finalement 48.2 g de résidu et 51.8 g de produits solubles. Dans le cas des résidus, l'hydrolyse enzymatique a permis de convertir 58% de l'holocellulose en glucose. Ce dernier est fermenté en éthanol avec un rendement de 14%.

Dans le cas des filtrats, le rendement d'hydrolyse enzymatique en xylose est de l'ordre de 60%; par contre les rendements de fermentation sont très faibles (5%). Les résultats d'hydrolyse enzymatique et de fermentation sont rapportés dans la deuxième partie de ce rapport.

Le bilan d'énergie (annexe D) a permis d'établir que 0.59 kg de vapeur était nécessaire pour chauffer un kilogramme de bois lors d'un prétraitement à 220°C.

8.0 RECOMMANDATIONS

1. Une avenue intéressante à exploiter pour le prétraitement du matériel lignocellulosique serait de travailler à des températures élevées de l'ordre de 220°C et de courts temps de résidence à savoir 0-20 secondes. De cette façon il serait possible d'atteindre une très grande sélectivité des hémicelluloses tout en minimisant la solubilisation de la cellulose.

2. En terme de récupération d'énergie, une recompression mécanique de la vapeur pourrait être envisagée. La contamination de cette vapeur par des produits de condensation tels que acide acétique et acide formique, etc. devrait être prise en considération.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

BIBLIOGRAPHIE

ASPLUND, A.J.A., U.S. Patent # 2,008,892 (1935)
Method of Manufacture of Pulp.

BOUCHARD, J., Léger, S., Chornet, E., et Overend, R.P., 1986
Quantification of residual polymeric families present in thermo-mechanical and chemically potentiel lignocellulosics via thermal analysis. Biomass 9; in press

Aronowsky, S.Y. et Gortner, R.A. (1936) Ind. and Eng. Chem., 28 (11), 1270

Bender, R., U.S. Patent 4, 136, 207 (1979)

Delong, E.A., Can. Patent, # 1,096,374 (1981)

Strapp, R.K. (1956). High yield sulphite pulping. Part VII; the Ross diagram, Tappi, 39 (4), 244

ANNEXE "A"

TECHNIQUES ANALYTIQUES

CRIQ

A CARACTÉRISATION DES SUBSTRATS

La caractérisation des substrats a consisté en la détermination:

- de la composition polymérique de chacun d'eux;
- du degré de polymérisation moyen;
- des cendres et leurs compositions;
- de la composition élémentaire;
- de la composition en sucres: monomères par chromatographie en phase gazeuse.

A.1 Composition polymérique du substrat

Il s'agissait de quantifier la cellulose, les hémicelluloses et la lignine pour chacun des substrats considérés. Nous avions à notre disposition deux techniques analytiques.

La première étant la méthode dite humide se base sur des normes standards; le principal inconvénient de cette dernière est la durée de ces analyses, c'est-à-dire 1 à 2 jours(s) pour déterminer les trois polymères. De plus cette technique a été développée pour le bois non traité et non pour des résidus, ce qui amène des difficultés pour comptabiliser les complexes lignine carbohydrate.

La deuxième méthode à notre disposition était l'analyse thermique (Bouchard et Al.). Son principe comme son nom l'indique est basé sur la dégradation thermique de chaque constituant. A chaque polymère correspond une température caractéristique de dégradation

CRIQ

thermique qui est observée par une perte de poids. C'est cette méthode qui a été adoptée pour cette détermination. L'avantage de cette méthode de détermination est sa rapidité d'exécution; en effet, deux heures est le temps requis pour obtenir la composition qualitative et quantitative d'un échantillon. Les résultats sont présentés au Tableau I en annexe.

A.2 Analyse de la viscosité (Degré de polymérisation moyen de la cellulose - NF.T 12.00S Mars 1953)

La méthode consiste à mesurer la viscosité spécifique d'une solution de cellulose dans la cupriéthylènediamine et à en déduire le degré de polymérisation moyen. Le degré de polymérisation viscosimétrique DP (quotient de la masse moléculaire moyenne viscosimétrique par la masse moléculaire du motif de polymérisation choisi= allogulcane en l'occurence) est relié à la viscosité intrinsèque par la relation:

$$\text{Viscosité intrinsèque} = K \overline{DP}_v^{\alpha}$$

K et α étant des coefficients caractéristiques du système polymère-solvant et du motif de polymérisation. Les résultats sont présentés au Tableau IV en annexe.

A.3 Détermination des cendres et leurs compositions

La détermination des cendres est effectuée en suivant la norme standard ASTM D-1102-56.

CRIQ

La composition des cendres est déterminée par absorption atomique sur Varian Techtron. Les résultats sont présentés au Tableau III en annexe.

A.4 Détermination de la composition élémentaire

La composition élémentaire, soit le pourcentage de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote, est réalisée sur un analyseur élémentaire Perkin-Elmer modèle 240 C. Les résultats sont présentés au Tableau II.

A.5 Détermination de la composition en sucres

Cette détermination comporte plusieurs étapes. La première consiste en une hydrolyse acide du résidu selon la méthode TAPPI T249 m 75. Cette phase d'hydrolyse se subdivise elle-même en plusieurs sous-étapes, c'est-à-dire:

- préhydrolyse;
- hydrolyse;
- neutralisation;
- concentration;
- analyse es monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse.

A.5.1 Préhydrolyse

La préhydrolyse conduit à un mélange d'oligosaccharides Les conditions optimales de préhydroloyse retenues sont une concentration en acide sulfurique de 72% et un temps de résidence de 1 heure à 30° C dans un bain d'eau.

A.5.2 Hydrolyse

L'hydrolyse réalise la transformation des oligosaccharides en monosaccharides. Elle s'effectue dans des conditions beaucoup plus douces que la préhydrolyse, à savoir:

. la concentration en acide sulfurique= 3%;
. un temps de résidence de 1 heure à l'autoclave à 120° C sous une pression de 103 Pa.

A.5.3 Neutralisation

L'agent de neutralisation choisi est l'hydroxyde de baryum et le pH de neutralisation est 6. Au-delà, la solution est alcaline et une réversion des monosaccharides peut être observée.

A.5.4 Concentration

La concentration de la solution a lieu dans un évaporateur rotatif sous vide dans un bain à 40° C.

A.5.5 Analyse des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse

Les monosaccharides peuvent être analysés par chromatographie en phase gazeuse. Les carbohydrates doivent être exempts d'eau et rendus volatils par dérivation. Le réactif de dérivation retenu est le triméthylsillylimidazote (TSIM). Une fois syllilés les monosaccharides peuvent être injectés dans le système chromatographique qui se compose d'un chromatographe Hewlett

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Packard 5880 muni d'une colonne ayant les caractéristiques suivantes:

. colonne en verre: 10 m x 520
. Packing: méthyl silicone gum.

Le détecteur est à ionisation de flamme et les données sont enregistrées par un intégrateur électronique HP 3390A.

Conditions expérimentales:

. Injecteur et colonne:

Gaz porteur= N_2
Débit du gaz porteur= 10 mL/min
Température à l'injecteur= 200° C
Programmation de température= 150 à 200° C
1° C/min

. Détecteur:

Température= 250° C

Le sorbitol a été choisi comme standard interne. Les résultats sont présentés au Tableau V en annexe.

Un schéma de la procédure analytique des solides pour les résidus (gâteaux) et les filtrats est présenté en annexe aux schémas nos 1 et 2.

ANNEXE "B"

CARACTÉRISATION DES SUBSTRATS LIGNOCELLULOSIQUES

CRIQ

TABLEAU I

COMPOSITION DES SUBSTRATS (EXTRAITS A L'EAU) EN HOLOCELLULOSE, CELLULOSE ET LIGNINE PAR ANALYSE THERMIQUE (sur base sèche)

SUBSTRAT	HOLOCELLULOSE	CELLULOSE	LIGNINE	LIGNINE / HOLOCELLULOSE
Populus Deltoïdes	79,8	51,7	20,2	,25
Populus Tremuloïdes	79,9	60,2	20,1	,25
Tiges de maïs	70,3	42,4	29,7	,25

CRIQ

TABLEAU II

ANALYSE ÉLÉMENTAIRE

(Résultats corrigés par les cendres)

SUBSTRAT	C (%)	H (%)	N (%)	CENDRES (%)	C cor. (%)	H cor. (%)	N cor. (%)	O + S d (%)
Populus Deltoïdes	47,6	6,0	0,10	0,65	47,9	6,0	0,1	46,0
Populus Tremuloïdes	48,0	6,1	0,10	1,00	48,5	6,1	0,1	42,3
Tiges de maïs	44,6	5,7	0,98	8,7	48,9	6,3	1,1	43,7

CRIQ

TABLEAU III

COMPOSITION DES CENDRES POUR CHACUN DES TROIS SUBSTRATS

COMPOSITIONS (%)	POPULUS DELTOÏDES (%)	POPULUS TREMULOÏDES (%)	TIGES DE MAÏS (%)
Cendres	0,65	1,0	8,7
Calcium	14,7	15,6	4,1
CaO	20,7	21,9	5,7
Sodium	0,7	0,5	0,7
Na_2O	1,0	0,7	1,0
Potassium	21,7	18,5	22,7
K_2O	26,2	22,3	27,4
Magnésium	3,5	3,1	2,3
MgO	5,8	5,4	3,8
Silice	Traces	Traces	----

TABLEAU IV

DEGRÉ DE POLYMÉRISATION DES SUBSTRATS CONSIDÉRÉS

SUBSTRAT	DEGRÉ DE POLYMÉRISATION MOYEN
Populus Deltoïdes	430
Populus Tremuloïdes	400
Tiges de maïs	1 094

CRIQ

ANNEXE "C"

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

CRIQ

TABLEAU V: SÉRIE I - POPULUS DELTOIDES

EXPÉRIENCE	CONDITIONS EXPÉRIMENTALES			CONVERSION %	COMPOSITE DE RÉSIDU SEC (ramené à 100 g de bois sec)			
	T °C	P MPa	T (sec)		Holocellulose(g)	Cellulose(g)	Hémicellulose(g)	Lignine(g)
Pop. Deltoides extrait eau					79,2	51,4	27,9	20,1
FPD-47	220	37	88	58,01	30,9	27,3	3,6	11,0
FPD-50	220	36	88	51,51	36,9	32,4	4,5	11,1
FPD-46	220	31	88	48,24	39,6	35,5	4,2	12,0
FPD-53	200	31	88	40,12	48,6	39,8	9,0	11,0
FPD-51	180	31	88	31,04	55,9	41,8	14,1	13,0

CRIQ

TABLEAU VI: SÉRIE I = POPULUS DELTOIDES

EXPÉRIENCE	CONDITIONS EXPÉRIMENTALES			CONVERSION %	COMPOSITION DU RÉSIDU EN SUCRE MONOMERIQUE (% de sucre / à l'holocellulose du résidu)					
	T °C	P MPa	T (sec)		ARABINOSE	XYLOSE	MANNOSE	GALACTOSE	GLUCOSE	SUCRE
Pop. Deltoides extrait eau					3,0	14,7	4,2	1,8	38,2	62
FPD-47	220	37	88	58,0	0	4,7	1,6	0,21	97,5	104
FPD-50	220	36	88	51,5	0	5,0	1,7	0,2	88,4	95
FPD-46	220	31	88	48,2	0	6,6	1,9	0,7	102,8	112
FPD-53	200	31	88	40,1	0,3	15,4	1,9	0,4	64,1	82
FPD-51	180	31	88	31,0	0,3	19,7	1,9	0,6	56,1	83

CRIQ

TABLEAU VII: SÉRIE II = POPULUS TREMULOIDES

EXPÉRIENCE	CONDITIONS EXPÉRIMENTALES			CONVERSION %	COMPOSITE DE RÉSIDU SEC (ramené à 100 g de bois sec)			
	T °C	P MPa	T (sec)		Holocellulose(g)	Cellulose(g)	Hémicellulose(g)	Lignine(g)
Pop. Deltoides extrait eau					79,9	60,2	19,7	20,1
FPT-01	177	23	88	11,64	71,4	53,3	18,1	16,9
FPT-07	180	34	88	18,03	64,6	45,2	19,3	17,3
FPT-06	193	35	88	25,33	57,9	44,3	13,6	16,7
FPT-02	200	35	88	38,61	49,8	40,1	9,6	11,5
FPT-04	217	34	88	31,96	51,1	44,0	7,1	16,9
FPT-05	220	35	88	30,80	51,1	48,2	2,9	18,4
FPT-03	220	35,5	88	38,90	49,5	44,5	5,0	11,6

* Ces calculs sont faits à partir des pourcentages des différents constituants obtenus par analyse thermique à savoir, par exemple: gr d'holocellulose = % holocellulose (1. conversion) dans le résidu obtenu par ATG

CRIQ

TABLEAU VIII: SÉRIE II = POPULUS TREMULOIDES

EXPÉRIENCE	CONDITIONS EXPÉRIMENTALES			CONVERSION %	COMPOSITION DU RÉSIDU EN SUCRE MONOMERIQUE (% de sucre / à l'holocellulose du résidu)					
	T °C	P MPa	T (sec)		ARABINOSE	XYLOSE	MANNOSE	GALACTOSE	GLUCOSE	SUCRE
Pop. Tremuloïdes extrait eau					1,5	16,1	2,4	0,6	42,5	63,1
FPT-01	177	23	88	11,6	0,2	13,9	2,3	0,8	65,6	82,8
FPT-07	180	34	88	18,0	0,1	13,3	3,6	1,6	61,9	80,5
FPT-06	193	35	88	25,3	0,1	10,6	3,8	1,6	59,4	75,5
FPT-02	200	35	88	38,6	0,1	11,2	2,2	0,5	70,5	84,5
FPT-04	217	34	88	32,0	0,0	6,6	3,1	1,2	73,2	84,1
FPT-05	220	35	88	31,8	0,0	5,6	3,3	1,2	79,3	89,4
FPT-03	220	35,5	88	38,9	0,0	4,3	1,6	0,4	74,3	80,6

CRIQ

TABLEAU IX: SÉRIE III = TIGES DE MAIS

EXPÉRIENCE	CONDITIONS EXPÉRIMENTALES			CONVERSION %	COMPOSITE DE RÉSIDU SEC (ramené à 100 g de bois sec)			
	T °C	P MPa	T (sec)		Holocellulose(g)	Cellulose(g)	Hémicellulose(g)	Lignine(g)
Tiges de maïs extrait eau					70,3	42,4	27,8	29,7
FTM-3	180	30	88	66,26	26,8	19,5	7,3	7,0
FTM-6	180	30	88	43,90	42,2	34,3	7,8	13,9
FTM-4	200	31	88	76,49	18,6	12,9	5,6	4,9
FTM-5	220	30	88	57,64	28,9	22,5	5,6	13,6
FTM-7	150	32,5	88	57,86	31,9	24,6	7,3	10,7

TABLEAU X: SÉRIE III = TIGES DE MAIS

EXPÉRIENCE	CONDITIONS EXPÉRIMENTALES			CONVERSION %	COMPOSITION DU RÉSIDU EN SUCRE MONOMERIQUE (% de sucre / à l'holocellulose du résidu)					
	T °C	P MPa	T (sec)		ARABINOSE	XYLOSE	MANNOSE	GALACTOSE	GLUCOSE	SUCRE
Tiges de maïs extrait eau					4,8	2,8	4,2	-	54,9	
FTM-3	180	30	88	66,3	2,8	25,6	0,9	0,5	51,7	81,5
FTM-6	180	30	88	43,9	5,3	28,8	3,7	-	64,8	102,6
FTM-4	200	31	88	76,5	3,1	25,0	0,4	0,5	53,6	82,6
FTM-5	220	30	88	57,6	3,4	23,0	2,2	-	62,6	91,2
FTM-7	150	32,5	88	57,9	6,7	27,8	3,4	-	56,9	94,8

ANNEXE "D"

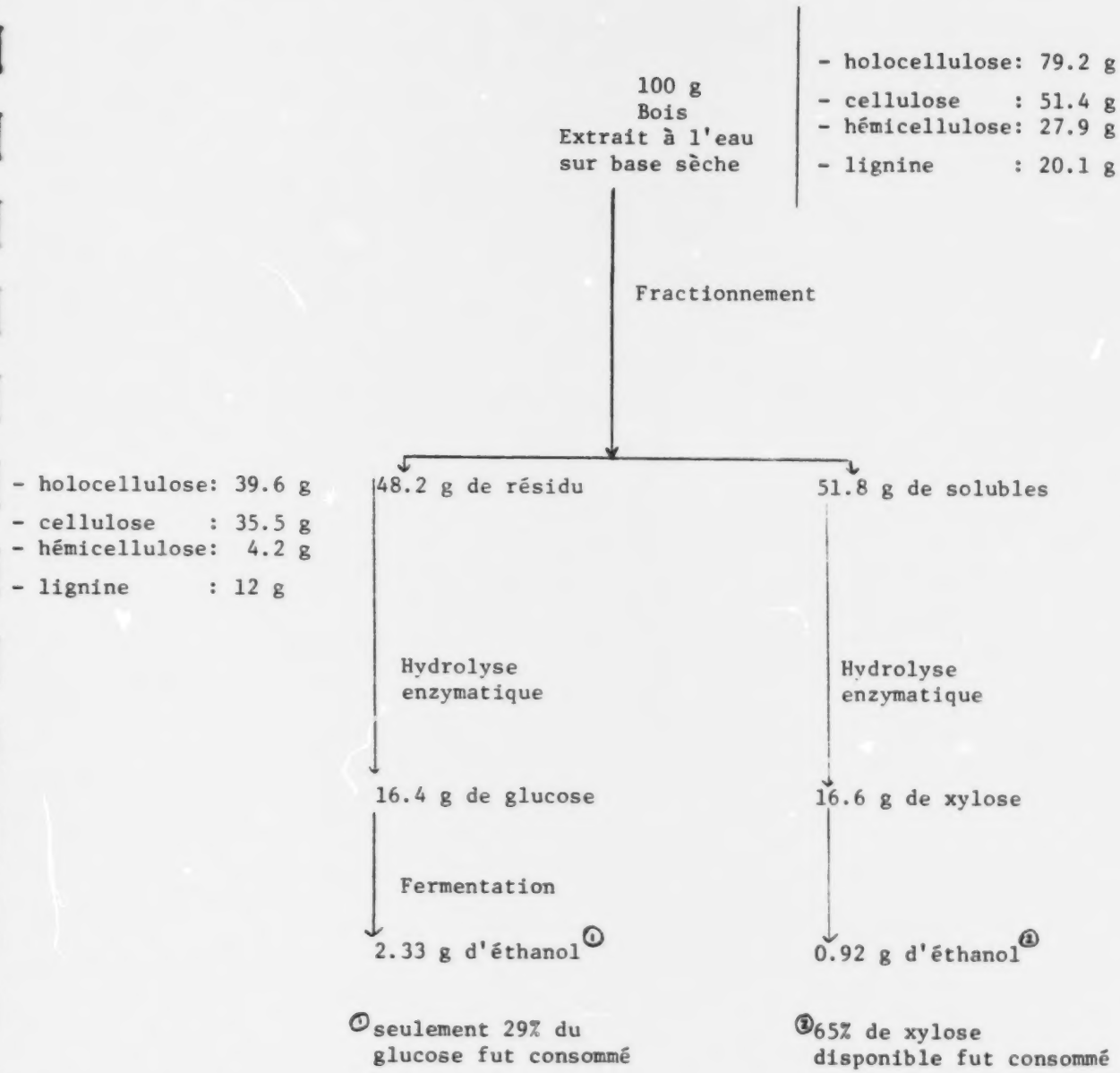
BILAN DE MATIERE
BILAN D'ÉNERGIE

CRIQ

BILAN DE MATIERE

POPULUS DELTOIDES

(No 1)



BILAN DE MATIERE

POPULUS TREMULOIDES

(No 3)

100 g Bois

Extrait de l'eau
- holocellulose: 81.5 g
- cellulose : 58.4 g
- hémicellulose: 23.1 g
- lignine : 18.5 g

Fractionnement

88.4 g de résidu sec extrait à l'eau

Holocellulose: 71.5 g
Cellulose : 53.3 g
Hémicellulose: 18.2 g
Lignine : 16.9 g

11.64 g solubles

Hydrolyse enzymatique

24 g de glucose

Hydrolyse enzymatique

8.65 g de xylose

Fermentation

7.2 g d'éthanol (1)

0.61 g d'éthanol (2)

(1) 100% de glucose consommé

(2) 79% de xylose disponible fut consommé

CRIQ

Bilan d'énergie du procédé de fractionnement du matériel lignocellulosique

Hypothèses:
- . DE cinétique négligeable
- . DE potentielle négligeable DV=W
- . Système adiabatique
- . Ou assume que toute la vapeur se condense

INPUT

Le mélange de départ est une solution de bois et d'eau à 15% (P/V)

Le débit de la pompe. $Q = 0.8 \frac{l}{min} = .8 \frac{kg}{min} = 48 \frac{kg}{h.}$

qui se décompose de $7.2 \frac{kg}{h.}$ bois

$40.8 \frac{kg}{h.}$ eau

Température initiale: 20° C
Température finale : 220° C

Nous considérons que les chaleurs spécifiques du bois et de l'eau sont une fonction de la température (Annexe D-8).

a) La chaleur spécifique de l'eau a été obtenue en faisant la moyenne logarithmique des chaleurs spécifiques aux températures considérées

$$Cp_{ln} = \frac{4.78 - 4.20}{\ln \frac{4.18}{4.29}}$$

$$Cp_{ln} = 4.23 \frac{kj}{kg°C}$$

La variation d'enthalpie de l'eau sera donc

$$DH_{eau} x Cp_{ln} * (20°C - 220°C)$$

$$= 40.8 \frac{kg}{h} \times 4.23 \frac{kj}{kg°C} \times (-200°C)$$

$$DH_{eau} = - 34,555.66 \frac{kj}{h}$$

CRIQ

b) La chaleur spécifique du bois est obtenue à partir de l'expression suivante:

$Cp = 0.266 + 0.00166T$ (WENZL)

La variation d'enthalpie du bois sera donc

$$DH_{bois} = m_{bois} \times \int_{20}^{220} CpdT =$$

$$= m_{bois} \times \int_{20}^{220} (0.266 + 0.00166T)dT$$

$$= 7.2 \frac{kg}{h} * 81.04 \frac{kcal}{kg} * 4.18 \frac{kj}{kcal}$$

$$= 2438.98 \frac{kj}{h}$$

La variation d'enthalpie de la solution de bois sera finalement de:

$$DH_{slurry} = DH_{eau} + DH_{bois}$$
$$= 34555.66 - 2438.98$$
$$= 36994.64 \frac{kj}{h}$$

La quantité de vapeur nécessaire au chauffage de la suspension par unité de temps:

$$DH_{condensation} = H_{vap\ 220°C} - H_{eau\ 100°C}$$
$$= 2802.1 - 903.62$$
$$= 1858.48 \frac{kj}{kg}$$

Sachant que la quantité de chaleur par unité de temps est de: $.36994.64 \frac{kj}{h}$

La quantité de vapeur nécessaire sera donc

$$= \frac{.36994.64}{1858.48}$$

= -19.90 kg de vapeur par heure.

CRIQ

OUTPUT

Après le "flash", on a:

7,2 kg bois → 7,2 kg bois prétraité à 100° C
60,7 kg eau → x kg eau à 100° C
y kg vapeur à 100° C .

Énergie fournie par la pompe

Chaleur relachée par le bois:

$$H_{220-100^\circ C} = \int_{220}^{100} CpdT$$

$$= (0{,}266 \times 120) + \left[\frac{0{,}00116 \times 220^2}{2} - \frac{0{,}00116 \times 100^2}{2}\right]$$

$$= 54{,}19 \ \frac{kcal.}{kg} \times 4{,}18 \ \frac{kJ}{kcal.}$$

$$= 226{,}51 \ \frac{kJ}{kg}$$

Nous avons donc à résoudre un système de 2 équations à 2 inconnus.

[1] $226{,}51 \frac{kJ}{kg} \times 7{,}2 \frac{kg}{h} + 60{,}7 \frac{kg}{h} \times 943{,}62 \frac{kJ}{kg} = \left(x_{eau} \times 419{,}04 \frac{kJ}{kg}\right) + \left(y_{vap} \times 2676 \frac{kJ}{kg}\right)$

$$58\,908{,}61 \frac{kJ}{h} = (x_{eau} \times 419{,}04) + (y_{vap} \times 2676)$$

[2] $$60{,}7 = x + y$$

$$x = 60{,}7 - y$$

[3] $$58\,908{,}61 \frac{kJ}{h} = \left[(60{,}7 - y) * 419{,}04 + y * (2676)\right]$$

$$= 25\,435{,}73 + y\,(2256{,}96)$$

$$y = 14{,}83 \text{ kg de vapeur}$$

$$x = 45{,}87 \text{ kg d'eau}$$

Si on considère l'énergie mise dans le système par la pompe P_{20}.

on pompe 48 L/h à 5500 psi
= (374 atm.)

donc pendant une heure l'énergie dépensée est:

$$374 \text{ atm.} \times 48 \frac{L}{h} = 17\,952 \text{ L. atm.}$$

$$= 1\,819{,}04 \text{ kJ/h}$$

CRIQ

Revenons à l'équation [3]:

$$58\,909{,}61 + 1819{,}04 = 25\,435{,}73 + y \times 2056{,}96$$

$y = 15{,}64$ kg de vapeur
$x = 45{,}06$ kg d'eau

Conclusion: la quantité de vapeur nécessaire pour chauffer 7,2 kg de bois est donc de:

$$19{,}90 \frac{\text{kg}}{\text{h}} = 15{,}64 \frac{\text{kg}}{\text{h}} = 4{,}26 \frac{\text{kg de vapeur}}{\text{h}}$$

soit $\frac{4{,}26}{7{,}2} = 0{,}59 \frac{\text{kg de vapeur}}{\text{kg de bois}}$

HEAT CAPACITY FOR WOOD

Données tirées de: The Chemical Technology of Wood
Herman F.J. Wenzl - Academic Press
Publishers (1970), p.84)

$H_{sp} = 0,266 + 0,00166\ t$

t = température en °C

	BOIS		EAU
	Cal./g	kJ/kg °C	
0° C	0,266	1,11	4,22
20° C	0,289	1,21	4,18
50° C	0,324	1,36	4,18
100° C	0,382	1,60	4,21
150° C	0,440	1,84	4,21
200° C	0,498	2,08	4,26
250° C	0,556	2,37	4,34

	Slurry à 8% (p/v)	Slurry à 15% (p/v)	Slurry à 20% (p/
0° C	3,9712	3,5870	3,5989
20° C	2,9424	3,7345	3,5860
50° C	3,9544	3,7570	3,6160
100° C	4,0012	3,8185	3,6880
150° C	4,0204	3,8545	3,7360
200° C	4,0856	3,9330	3,8240
250° C	4,1824	4,0445	3,9460

PARTIE II

DANS CETTE DEUXIÈME PARTIE, LES TRAVAUX SUIVANTS ONT ÉTÉ RÉALISÉS:

1. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES RÉSIDUS ET DES FILTRATS POUR L'OBTENTION DE SOLUTIONS SUCRÉES;

2. ÉVALUATION DE LA FERMENTESCIBILITÉ DESDITS RÉSIDUS ET FILTRATS.

TABLE DES MATIÈRES

1.0 INTRODUCTION 1

2.0 OBJECTIF GÉNÉRAL DE NOS TRAVAUX 3

3.0 TRAVAUX EFFECTUÉS ET RÉSULTATS OBTENUS 6
- 3.1 Réception des substrats prétraités et centrifugation 6
- 3.2 Extraction des sucres solubles présents dans les résidus 6
- 3.3 Concentration des extraits de sucres solubles 8
- 3.4 Composition des concentrés de sucres solubles 8
- 3.5 Extraction de la lignine des résidus prétraités 17
- 3.6 Hydrolyse enzymatique des résidus 20
- 3.7 Hydrolyse enzymatique des oligasaccharides présents dans les concentrés de sucres solubles extraits des différents bois prétraités 37
- 3.8 Fermentescibilité des sucres obtenus par hydrolyse enzymatique 39
- 3.9 Fermentation des hydrolysats obtenus après hydrolyse enzymatique des oligo-saccharides extraits des divers bois prétraités 57
- 3.10 Fermentaion des hydrolysts dérivés des résidus prétraités 67

4.0 DISCUSSIONS ET RECOMMANDATIONS 74
- 4.1 Extraction des sucres solubles présents dans les résidus prétraités 75
- 4.2 Extraction de la lignine 76
- 4.3 Hydrolyse enzymatique de oligosaccharides présents dans les concentrés de sucres solubles 77
- 4.4 Hydrolyse enzymatique des résidus (fibres cellulosiques) après la double extraction de la lignine 78
- 4.5 Fermentation des hydrolysats enzymatiques des oligosaccharides présents dans les filtrats (concentrés de sucres solubles).. 80
- 4.6 Fermentation des hydrolysats enzymatiques dérivés des résidus prétraités 83

CRIQ

TABLE DES MATIÈRES (Suite)

5.0 CONCLUSION GÉNÉRALE 85

6.0 RÉFÉRENCES 86

ANNEXE "A": Méthodes d'analyse

ANNEXE "B": Protocoles suivis pour l'extraction de la lignine et les hydrolyses exzymatiques.

ANNEXE "C": Travaux de fermentation: milieu de culture, conditions de croissance, préparation des inoculums, fermentation des sucres purs.

CRIQ

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I:	Traitement thermo-mécano-chimique en phase aqueuse des substrats lignocellulosiques: substrats employés et caractéristiques générales	2
TABLEAU II:	Substrats lignocellulosiques prétraités: séparation du filtrat et du résidu par centrifugation	7
TABLEAU III:	Quantité, concentration et acidité des concentrés de sucres solubles obtenus des substrats prétraités ...	12
TABLEAU IV:	Première série de tests d'hydrolyse enzymatique: composition des mélanges réactionnels	23
TABLEAU V:	Résultats des premiers tests préliminaires d'hydrolyse enzymatique de fibres cellulosiques (Référence Tableau IV)	24
TABLEAU VI:	Hydrolyse enzymatique en deux étapes des quatre résidus lignocellulosiques et de la cellulose "Solka-Floc"	32
TABLEAU VII:	Composition des divers mélanges réactionnels employés dans les tests préliminaires d'hydrolyse enzymatique des oligosaccharides présents dans les concentrés de sucres solubles	40
TABLEAU VIII:	Fermentation de sucres purs: résultats obtenus avec P. tannophilus, S. cerevisiae et Z. mobilis	58
TABLEAU IX:	Production d'éthanol par P. tannophilus à partir des sucres présents dans les hydrolysats obtenus des filtrats nos 1 et 2. Première expérience (agitation= 125 rpm)	61
TABLEAU X:	Production d'éthanol par P. tannophilus à partir des sucres présents dans les hydrolysats obtenus des filtrats nos 1 et 2. Deuxième expérience (agitation= 150 rpm)	62

CRIQ

LISTE DES TABLEAUX (Suite)

TABLEAU XI: Production d'éthanol par P. tannophilus à partir des sucres présents dans les hydrolysats obtenus des filtrats nos 3 et 4 (agitation= 150 rpm) 66

TABLEAU XII: Production d'éthanol par S. cerevisiae à partir des hydrolysats enzymatiques nos 1 et 2 dérivés des résidus prétraités 71

TABLEAU XIII: Production d'éthanol par S. cerevisiae à partir des hydrolysats enzymatiques nos 3 et 4 dérivés des résidus prétraités 73

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma simplifié des travaux effectués avec chaque substrat lignocellulosique prétraité par le procédé thermo-mécano-chimique en phase aqueuse de l'Université de Sherbrooke 5

Figure 2: Batterie de six petits tubes extracteurs de type SOXHLET (avec recirculation de l'extrait aqueux) employée pour l'extraction des sucres solubles résiduels présents dans les divers résidus 9

Figure 3: Tube extracteur de type SOXHLET (avec recirculation de l'extrait aqueux) de grande capacité aussi employé pour l'extraction par l'eau chaude des sucres solubles résiduels présents dans les divers résidus 10

Figure 4: Appareil utilisé pour la concentration sous vide partiel à 80 ± 5° C des extraits de sucres solubles et des extraits de lignine 11

Figure 5: Composition en sucres du concentré obtenu avec le substrat prétraité no 1 13

Figure 6: Composition en sucres du concentré obtenu avec le substrat prétraité no 2 14

Figure 7: Composition en sucres du concentré obtenu avec le substrat prétraité no 3 15

Figure 8: Composition en sucres du concentré obtenu avec le susbtrat prétraité no 4 16

Figure 9: Montage utilisé pour l'extraction de la lignine des résidus prétraités après extraction des sucres solubles résiduels par l'eau chaude 18

Figure 10: Concentrés de lignine obtenus après extraction de la lignine à partir des quatre substrats prétraités 19

Figure 11: Apparence des résidus après la double extraction de la lignine et séchage à l'air libre 21

CRIQ

LISTE DES FIGURES (Suite)

Figure 12: Analyse par chromatographie liquide sous haute pression du mélange de sucres solubles obtenus après hydrolyse enzymatique de la cellulose "Solka-Floc" pendant 48 heures 26

Figure 13: Analyse par chromatographie liquide sous haute pression du mélange de sucres solubles après hydrolyse enzymatique des fibres cellulosiques du résidu no 1 pendant 48 heures 27

Figure 14: Analyse par chromatographie liquide sous haute pression de la préparation commerciale d'enzymes cellulolytiques Celluclast 1,5 L après dilution (1/10) appropriée 28

Figure 15: Analyse, par chromatographie liquide sous haute pression, des sucres solubles produits durant l'étape no 1 de l'hydrolyse enzymatique des résidus nos 1 et 2 35

Figure 16: Analyse, par chromatographie liquide sous haute pression, des sucres solubles produits durant l'étape no 1 de l'hydrolyse enzymatique des résidus nos 3 et 4 36

Figure 17: Analyse, par chromatographie liquide sous haute pression, des sucres solubles obtenus après hydrolyse enzymatique des oligosaccharides présents dans le concentré de sucres solubles dérivé du résidu no 1 41

Figure 18: Analyse, par chromatographie liquide sous haute pression, des sucres solubles obtenus après hydrolyse enzymatique du xylan de mélèze 42

Figure 19: Montage utilisé pour les fermentations préliminaires employant des sucres purs 44

Figure 20: Fermentation d'un bouillon glucose 4% (p/v) par Pachysolen tannophilus ATCC 32691 ... 45

Figure 21: Fermentation d'un bouillon xylose 4% (p/v) par Pachysolen tannophilus ATCC 32691 ... 46

Figure 22: Fermentation d'un bouillon glucose 2% (p/v) + xylose 2% (p/v) par Pachysolen tannophilus ATCC 32691 47

CRIQ

LISTE DES FIGURES (Suite)

Figure 23: Fermentation d'un bouillon glucose 4% (p/v) par Saccharomyces cerevisiae no 1116 50

Figure 24: Fermentation d'un bouillon glucose 2% (p/v) + xylose 2% (p/v) par Saccharomyces cerevisiae no 1116 51

Figure 25: Fermentation d'un bouillon glucose 4% (p/v) par Zymomonas mobilis ATCC 10988 53

Figure 26: Fermentation d'un bouillon glucose 2% (p/v) + xylose 2% (p/v) par Zymomonas mobilis ATCC 10988 54

Figure 27: Analyse, par chromatographie liquide sous haute pression, du mélange hydrolysat no 1 + glucose 4% après 0 et 140 h de fermentation avec la levure P. tannophilus ATCC 10988 65

Figure 28: Fermentation des hydrolysats dérivés des résidus prétraités. Apparence des bouillons de fermentation suite à leur stérilisation à l'autoclave 69

CRIQ

1.0 INTRODUCTION

L'utilisation éventuelle, par voies biotechnologiques, des stocks lignocellulosiques pour la production de combustibles et de produits chimiques requiert avant toute chose la mise au point d'une technologie permettant de prétraiter les substrats lignocellulosiques afin de les rendre plus accessibles aux réactions enzymatiques et biologiques. Dans cette optique, l'Université de Sherbrooke a développé depuis quelques années une technologie permettant, par traitement thermo-mécano-chimique en phase aqueuse, d'effectuer une dépolymérisation sélective des substrats lignocellulosiques. Ce procédé a l'avantage de fonctionner à des pressions élevées et ainsi d'atteindre sévèrement les structures fibrillaires du bois. Dans le cadre du contrat OSR84-00098 du Ministère des Approvisionnements et Services Canada (M.A.S.), ce traitement a été effectué sur différents substrats lignocellulosiques. Ces travaux furent effectués à l'Université de Sherbrooke, sous la responsabilité de Line Jaulin du CRIQ, et les résultats obtenus sont présentés et discutés dans la première partie de ce rapport. Quatre de ces substrats ainsi prétraités (Tableau I) furent envoyés au CRIQ (Sainte-Foy) pour la suite des travaux. Ces substrats prétraités consistaient tous en une fraction liquide (filtrat) contenant probablement des sucres solubles et en une fraction solide (résidu) faite de fibres lignocellulosiques prétraitées.

TABLEAU I

TRAITEMENT THERMO-MÉCANO-CHIMIQUE EN PHASE AQUEUSE DES SUBSTRATS LIGNOCELLULOSIQUES: SUBSTRATS EMPLOYÉS ET CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES

SUBSTRAT NO	ORIGINE DU SUBSTRAT	PARAMÈTRES DU TRAITEMENT
1	Populus deltoïdes: feuillu à croissance rapide	220° C 27,58 MPa 88 secondes
2	Populus tremuloïdes: feuillu typique des forêts estriennes	220° C 36,54 MPa 88 secondes
3	Populus tremuloïdes	220° C 35,16 MPa 88 secondes
4	Populus deltoïdes	220° C 34,47 MPa 88 secondes

* Note: Un cinquième échantillon (FPD-59: 220° C - 43,44 MPa - 88 secondes) était aussi disponible. Toutefois, la quantité disponible de cet échantillon était très limitée et nous empêcha de poursuivre les travaux.

CRIQ

2.0 OBJECTIF GÉNÉRAL DE NOS TRAVAUX

L'objectif général était d'évaluer, après traitements appropriés et hydrolyse enzymatique, la fermentescibilité du filtrat et du résidu obtenus pour chacun des quatre substrats lignocellulosiques prétraités par le procédé thermo-mécano-chimique en phase aqueuse de l'Université de Sherbrooke. Pour ces travaux, la conversion des sucres en éthanol fut prise comme critère de fermentescibilité. Les résultats de fermentation devraient donc contribuer à évaluer la qualité des hydrolysats obtenus et à indiquer la présence ou non d'inhibiteurs.

Notre objectif général visant l'évaluation de la fermentescibilité des hydrolysats obtenus de substrats lignocellulosiques prétraités comprenait en fait plusieurs objectifs bien précis. Ceux-ci sont:

a) séparation du filtrat et du résidu pour chacun des substrats lignocellulosiques prétraités;

b) extraction des sucres solubles résiduels présents dans les résidus par l'eau chaude;

c) extraction de la lignine présente dans les résidus en milieu alcoolisé et acide. Concentration des extraits;

d) concentration et analyses des sucres solubles présents après combinaison du filtrat obtenu en (a) et de l'extrait obtenu en (b);

e) hydrolyse enzymatique de chacun des résidus après extraction de la majeure partie de la lignine. Concentration des hydrolysats;

f) hydrolyse enzymatique des sucres solubles présents dans l'extrait obtenu en (d) (sucres du filtrat original + sucres extraits du résidu par l'eau chaude;

g) fermentation des hydrolysats ainsi obtenus.

On trouvera à la Figure 1 un schéma simplifié du travail effectué pour chaque substrat lignocellulosique prétraité. Les divers travaux sont décrits en détail aux annexes A à C.

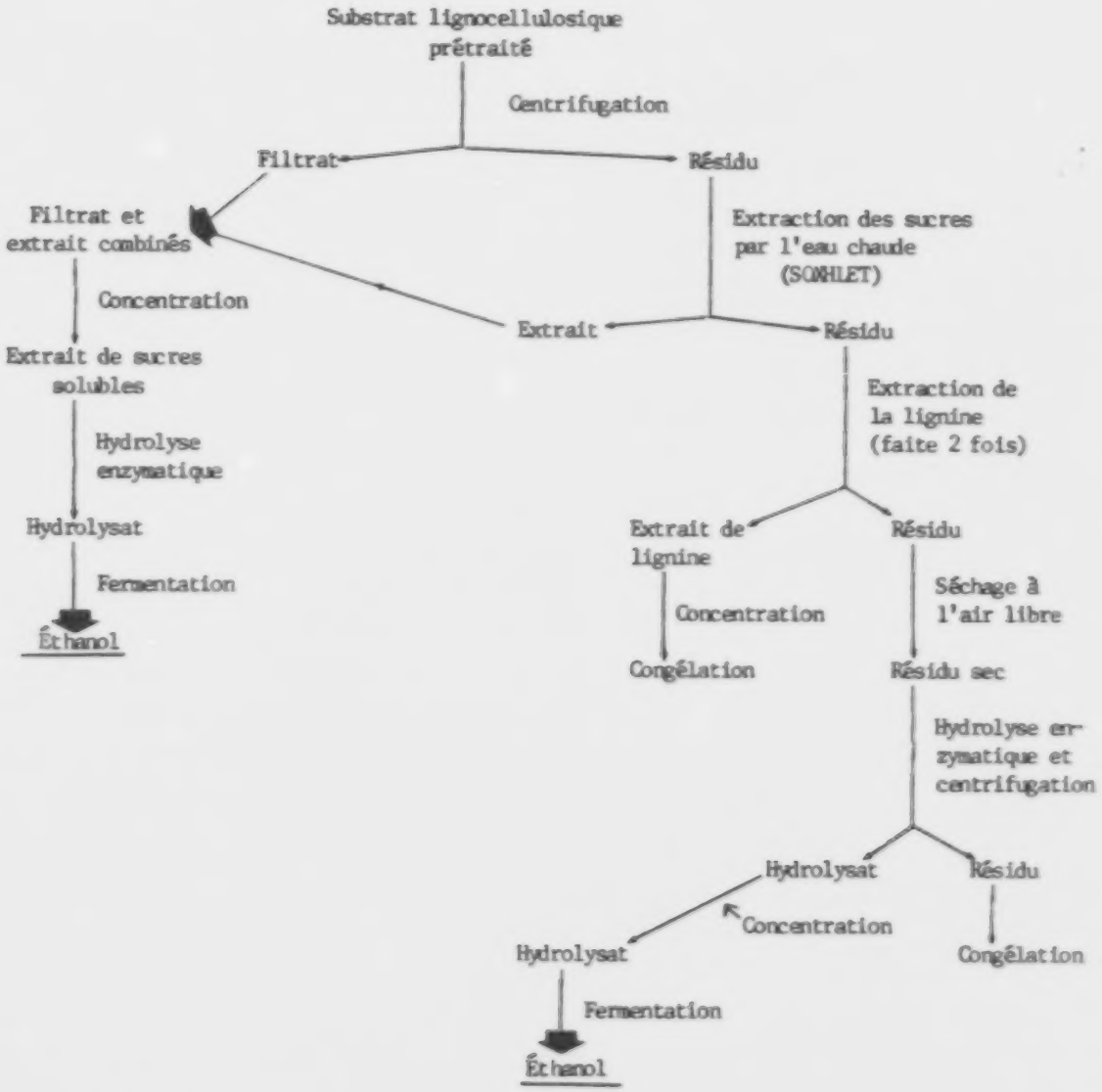


Figure 1: Schéma simplifié des travaux effectués avec chaque substrat lignocellulosique prétraité par le procédé thermo-mécano-chimique en phase aqueuse de l'Université de Sherbrooke.

3.0 TRAVAUX EFFECTUÉS ET RÉSULTATS OBTENUS

3.1 Réception des substrats prétraités et centrifugation

Les quatre substrats cellulosiques listés au Tableau I furent prétraités, selon les conditions indiquées pour chacun, dans l'unité de traitement thermo-mécano-chimique en phase aqueuse de l'Université de Sherbrooke et expédiés ensuite au CRIQ (Sainte-Foy) pour la suite des travaux. Suivant réception, les substrats furent centrifugés afin de séparer le filtrat (contenant des sucres solubles) et le résidu (fibres lignocellulosiques prétraitées). Le Tableau II présente les données de base recueillies à cette étape pour chaque substrat prétraité. Après centrifugation, les filtrats et les résidus furent placés au congélateur.

3.2 Extraction des sucres solubles présents dans les résidus

Il fut présumé que les résidus obtenus après centrifugation des substrats prétraités (voir 3.1 et Tableau II) contenaient encore une certaine quantité de sucres solubles. Ces sucres solubles furent donc extraits par l'eau chaude dans des tubes extracteurs de type SOXHLET avec recirculation de l'extrait aqueux. La Figure 2 montre la batterie de six petits tubes extracteurs employés à cet effet alors que la Figure 3 montre un tube extracteur de capacité beaucoup plus grande aussi employé pour cette extraction. L'extraction complétée, les extraits et les résidus furent congelés.

TABLEAU II

SUBSTRATS LIGNOCELLULOSIQUES PRÉTRAITÉS: SÉPARATION DU FILTRAT ET DU RÉSIDU PAR CENTRIFUGATION*

SUBSTRAT PRÉTRAITÉ NO	VOLUME DE L'ÉCHANTILLON (L)	APRÈS CENTRIFUGATION:**	
		VOLUME DU FILTRAT (L)	POIDS HUMIDE DU RÉSIDU (kg)
1	12	6,6	5,725
2	4,1	2,25	1,856
3	12-13	7,5	5,372
4	8	3,5	2,60

*: Centrifugation: 3500 rpm (2500 g), 10 minutes, 23° C, dans centrifugeuse Damon/IEC modèle DPR-6000 en volumes de 900-1000 mL.

**: Après centrifugation, les filtrats et les résidus furent placés au congélateur.

3.3 Concentration des extraits de sucres solubles

Pour chaque substrat lignocellulosique prétraité, le filtrat obtenu en 3.1 et l'extrait aqueux obtenu en 3.2 furent combinés et concentrés sous vide partiel à 80 ± 5° C (Figure 4). Les données recueillies à cette étape sont présentées au Tableau III. Les quatre concentrés étaient tous acides (pH= 4,0 ± 0,25) et avaient une concentration en matières dissoutes, mesurée à l'aide d'un réfractomètre, de l'ordre de 4,0 à 6,5° Brix. Les concentrés furent ensuite congelés.

3.4 Composition des concentrés de sucres solubles

Des échantillons de chacun des concentrés obtenus en 3.3 furent analysés par chromatographie liquide sous haute pression (HPLC) afin d'évaluer qualitativement la composition en sucres de ces concentrés. Des copies des chromatogrammes obtenus sont présentés dans les figures 5 à 8. Les conclusions suivantes peuvent être tirées:

a) les quatre concentrés de sucres solubles contiennent très peu de sucres simples (monosaccharides), tels le glucose et le xylose;

b) les sucres solubles présents dans ces quatre concentrés sont probablement des oligosaccharides (dérivés présumément de la cellulose ou des hémicelluloses du bois). En effet, ces sucres solubles montrent un temps d'élution de 9,06-9,13 min, ce qui est caractéristique d'oligosaccharides, et inférieur au temps d'élution connu pour le sucrose (un disaccharide) dans les mêmes conditions;

c) une hydrolyse (acide ou enzymatique) sera probablement requise afin de pouvoir fermenter ces sucres solubles.

CRIQ

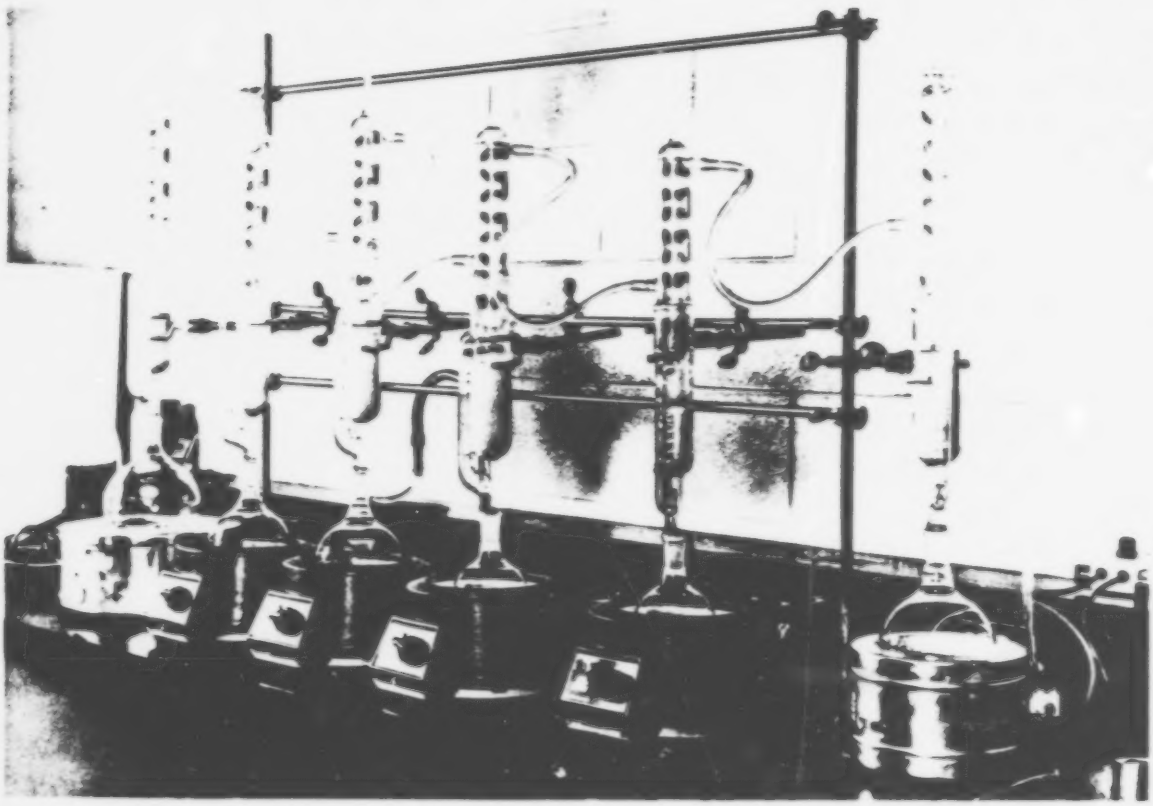


Figure 2: Batterie de six petits tubes extracteurs de type SOXHLET (avec recirculation de l'extrait aqueux) employée pour l'extraction des sucres solubles résiduels présents dans les divers résidus. Durée de l'extraction: deux fois 5 heures.

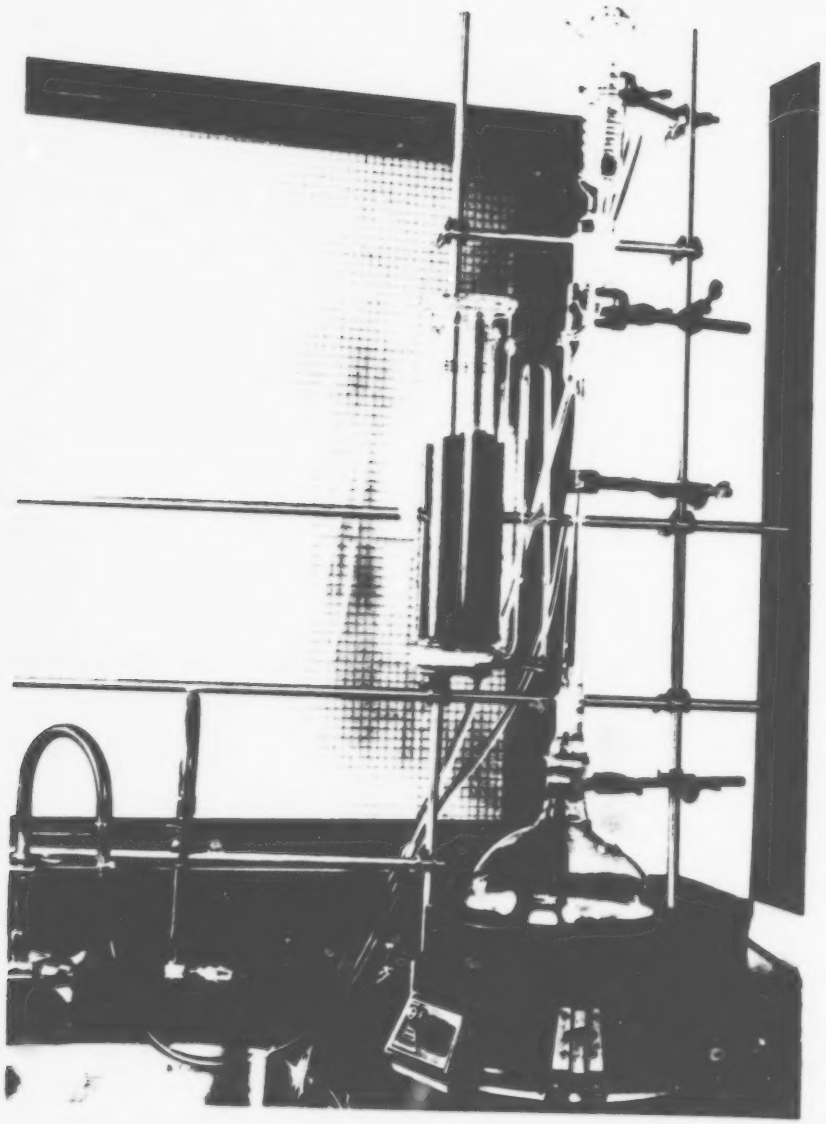


Figure 3: Tube extracteur de type SOXHLET (avec recirculation de l'extrait aqueux) de grande capacité aussi employé pour l'extraction par l'eau chaude des sucres solubles résiduels présents dans les divers résidus. Durée de l'extraction: 10 heures.

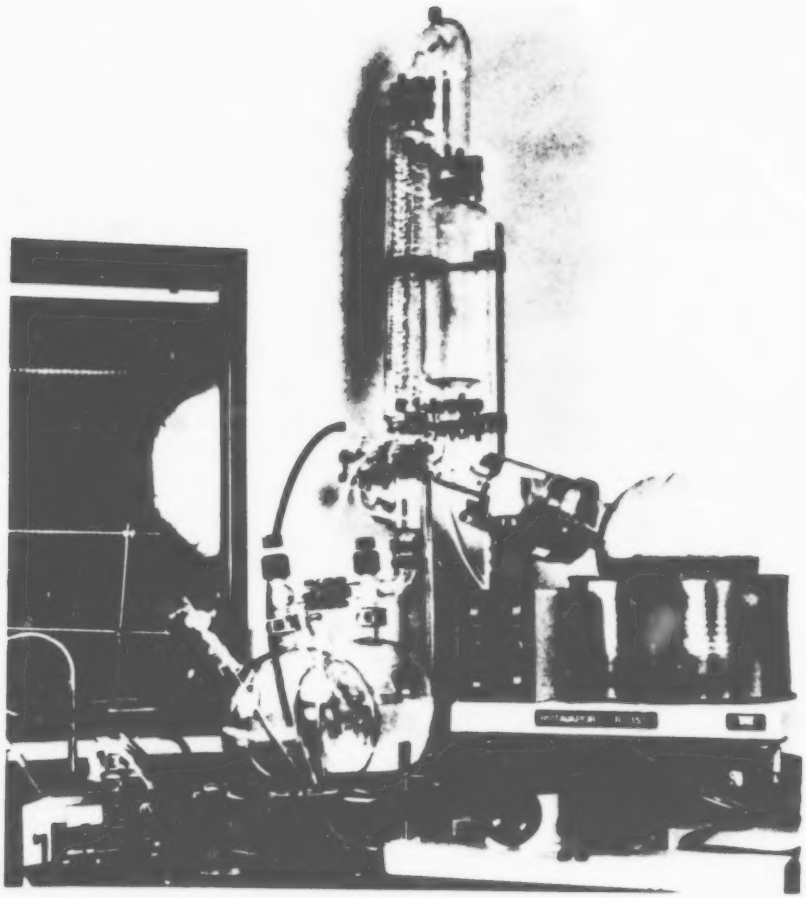


Figure 4: Appareil utilisé pour la concentration sous vide partiel à 80 ± 5° C des extraits de sucres solubles et des extraits de lignine.

TABLEAU III

QUANTITÉ, CONCENTRATION ET ACIDITÉ DES CONCENTRÉS DE SUCRES SOLUBLES OBTENUS DES SUBSTRATS PRÉTRAITÉS

SUBSTRAT PRÉTRAITÉ NO	CARACTÉRISTIQUES DU CONCENTRÉ DE SUCRES SOLUBLES*		
	VOLUME (L)	CONCENTRATION EN** MATIÈRES DISSOUTES (°BRIX)	ACIDITÉ (pH à 23° C)
1	3,6	6,5	4,24
2	1,2	6,0	3,92
3	3,7	6,5	3,87
4	3,3	4,0	4,01

*: Concentré obtenu après mélange du filtrat et de l'extrait de sucres solubles et concentration du mélange sous vide partiel.

**: Mesurée à l'aide d'un réfractomètre à 23° C.

CRIQ

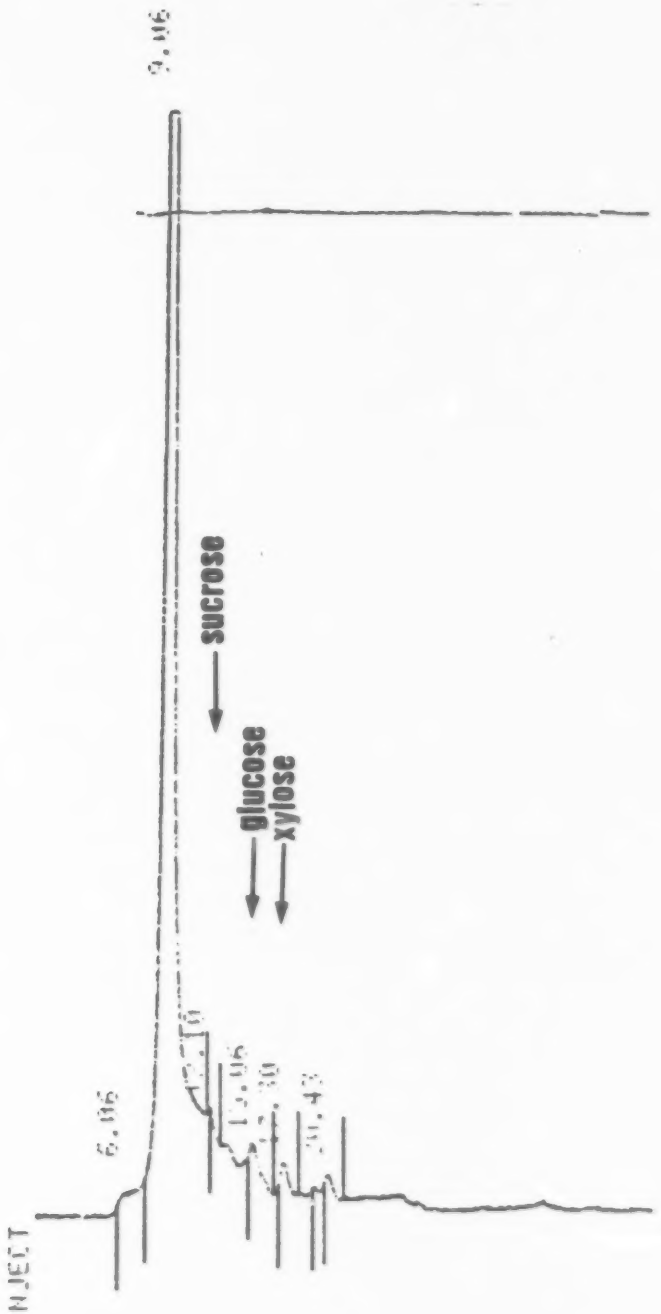


Figure 5: Composition en sucres du concentré obtenu avec le substrat prétraité no 1. Analyse qualitative par chromatographie liquide sous haute pression (HPLC).

CRIQ

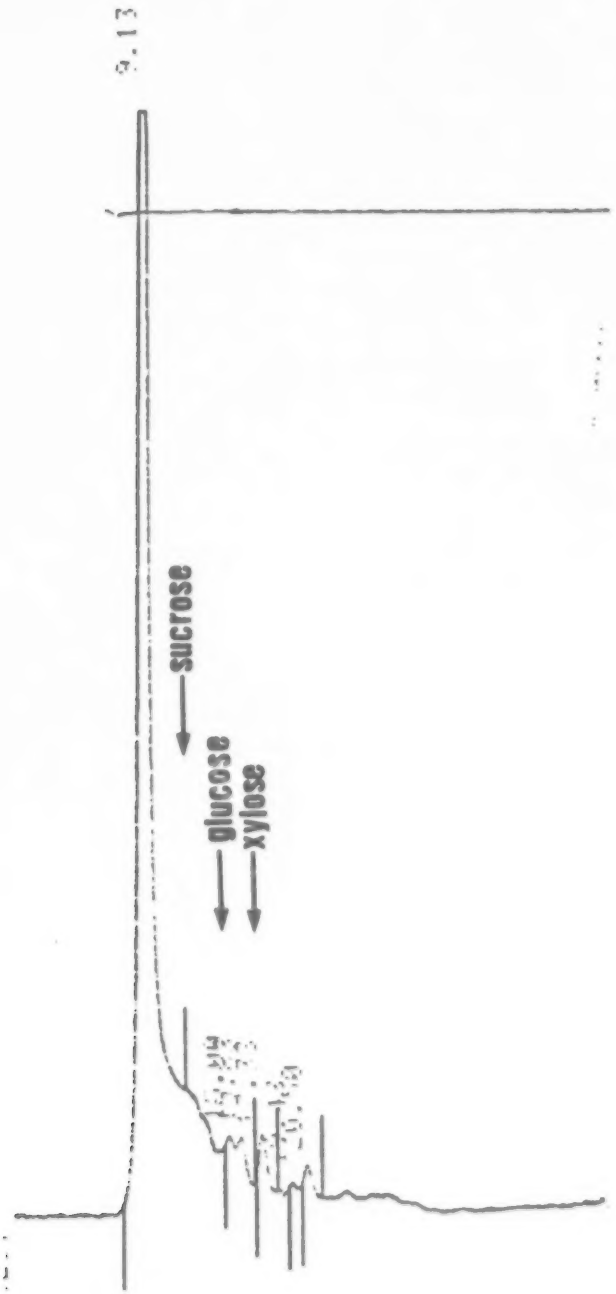


Figure 6: Composition en sucres du concentré obtenu avec le substrat prétraité no 2. Analyse qualitative par "HPLC".

CRIQ

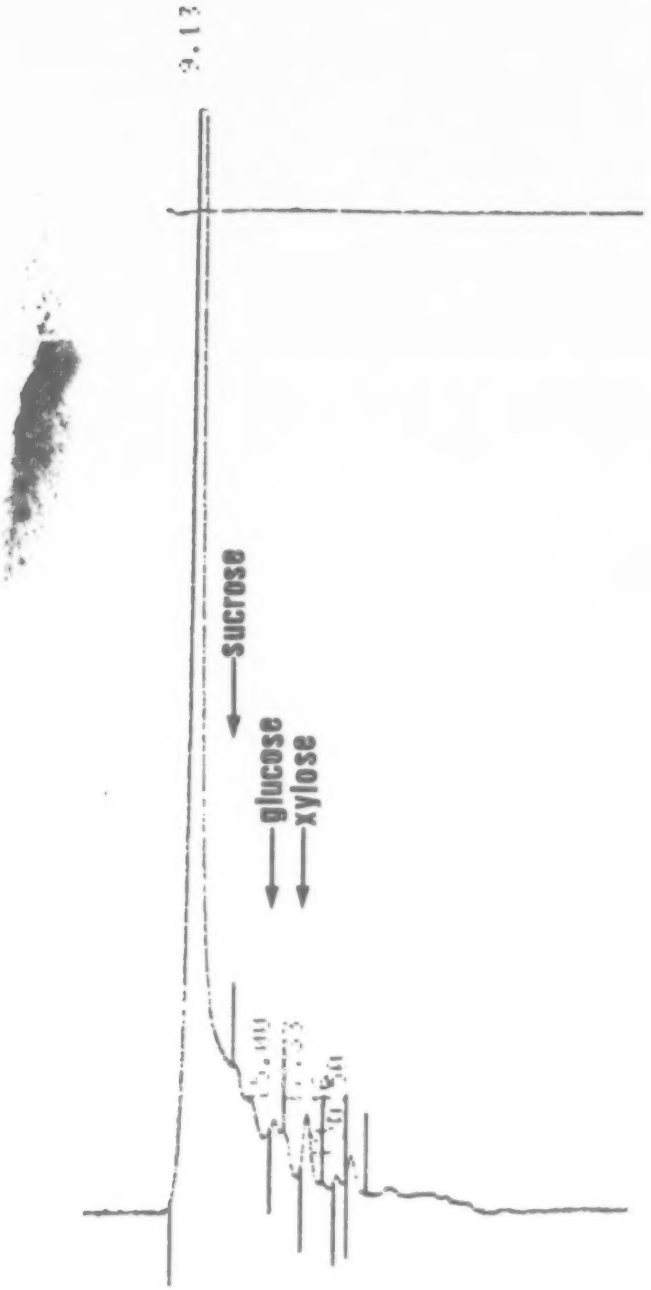


Figure 7: Composition en sucres du concentré obtenu avec le substrat prétraité no 3. Analyse qualitative par "HPLC".

CRIQ

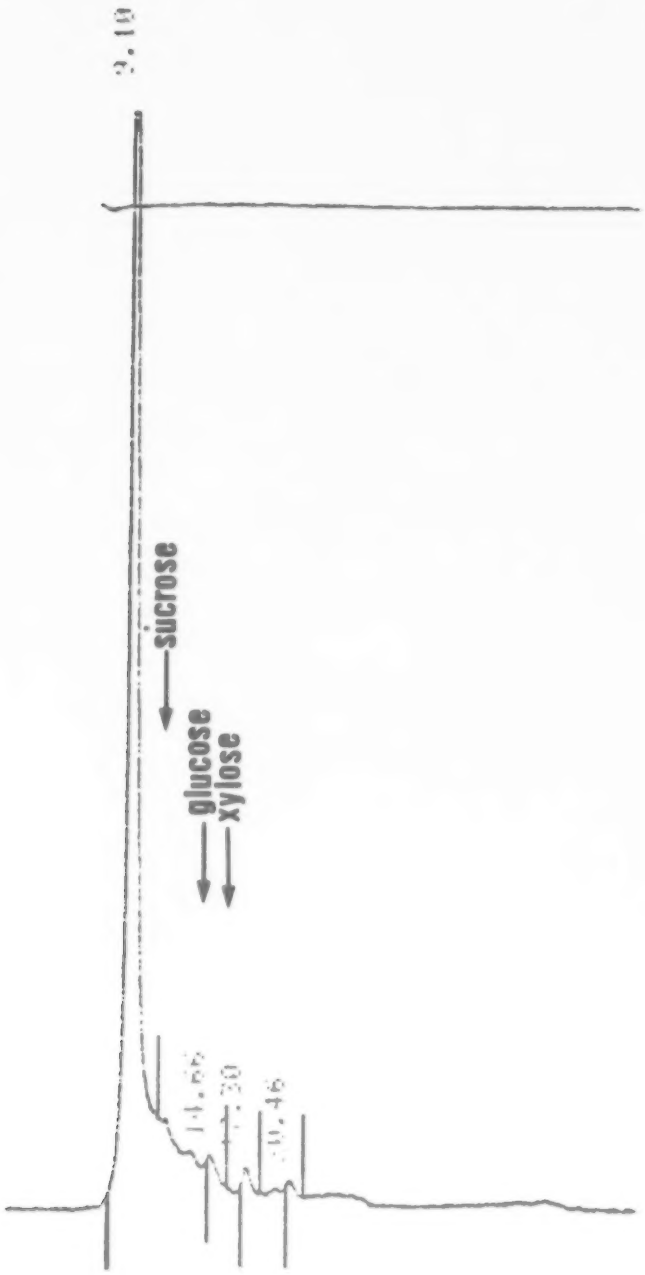


Figure 8: Composition en sucres du concentré obtenu avec le substrat prétraité no 4. Analyse qualitative par "HPLC".

CRIQ

3.5 Extraction de la lignine des résidus prétraités

Les quatre résidus prétraités, après extraction des sucres solubles résiduels par l'eau chaude (voir 3.2) et congélation, furent soumis à une extraction de lignine par reflux en milieu alcoolisé et acide (voir note ci-bas). Afin d'améliorer le rendement de l'extraction, celle-ci fut faite deux fois pour chaque résidu. On trouvera une photo du montage employé pour cette extraction à la Figure 9. Les extraits de lignine furent par la suite concentrés sous vide partiel (voir montage Figure 4). Durant cette concentration, une partie de la lignine précipita sur la paroi du ballon pour donner un précipité noirâtre. La concentration fut donc arrêtée à ce stage. Une photo des quatre concentrés de lignine est présentée à la Figure 10. On peut y remarquer la présence du précipité noirâtre de lignine.

Des échantillons des quatre concentrés de lignine furent par la suite apportés à l'Université de Sherbrooke pour analyses subséquentes.

Quant aux résidus obtenus après la double extraction de la lignine, ceux-ci furent séchés à l'air libre et seront plus tard hydrolysés enzymatiquement afin de préparer des hydrolysats pour des fermentations. La Figure 11 montre une photo des quatre résidus après la double extraction de la lignine et séchage à l'air libre.

Note: Méthode tirée de "Methods of Wood Chemistry", volume 2 (B. Browning), page 720.

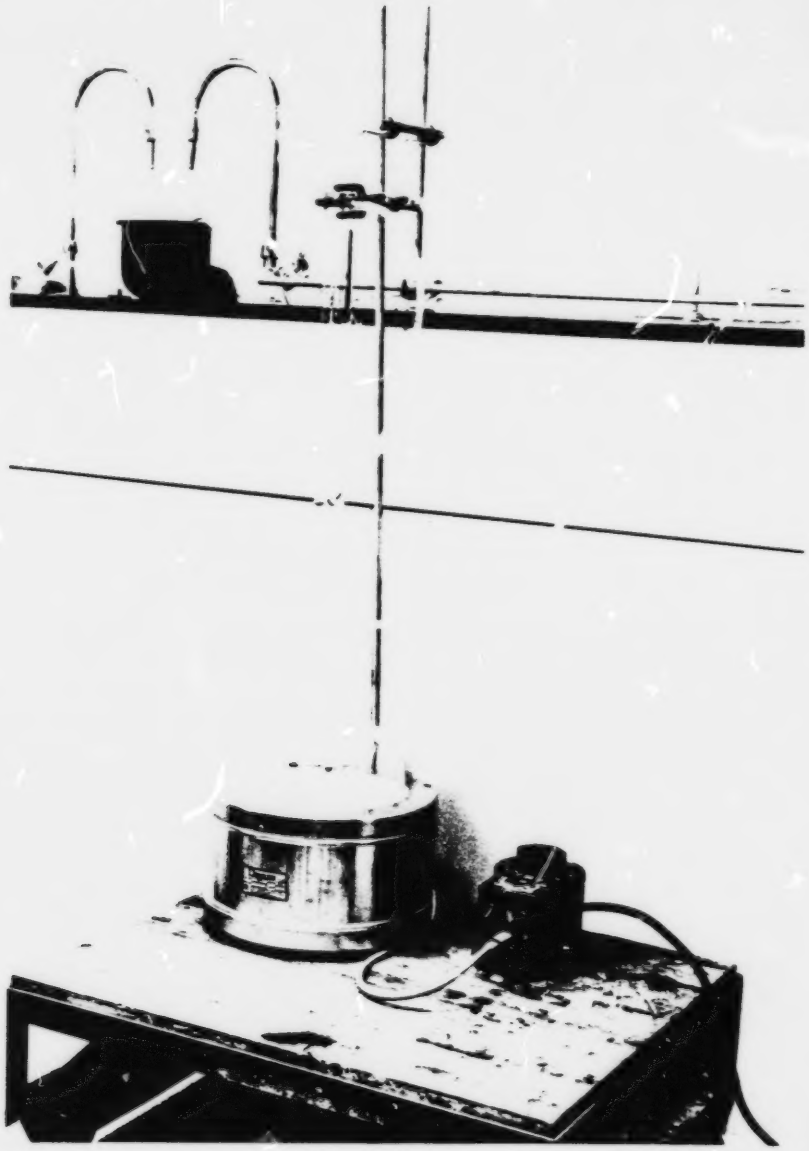
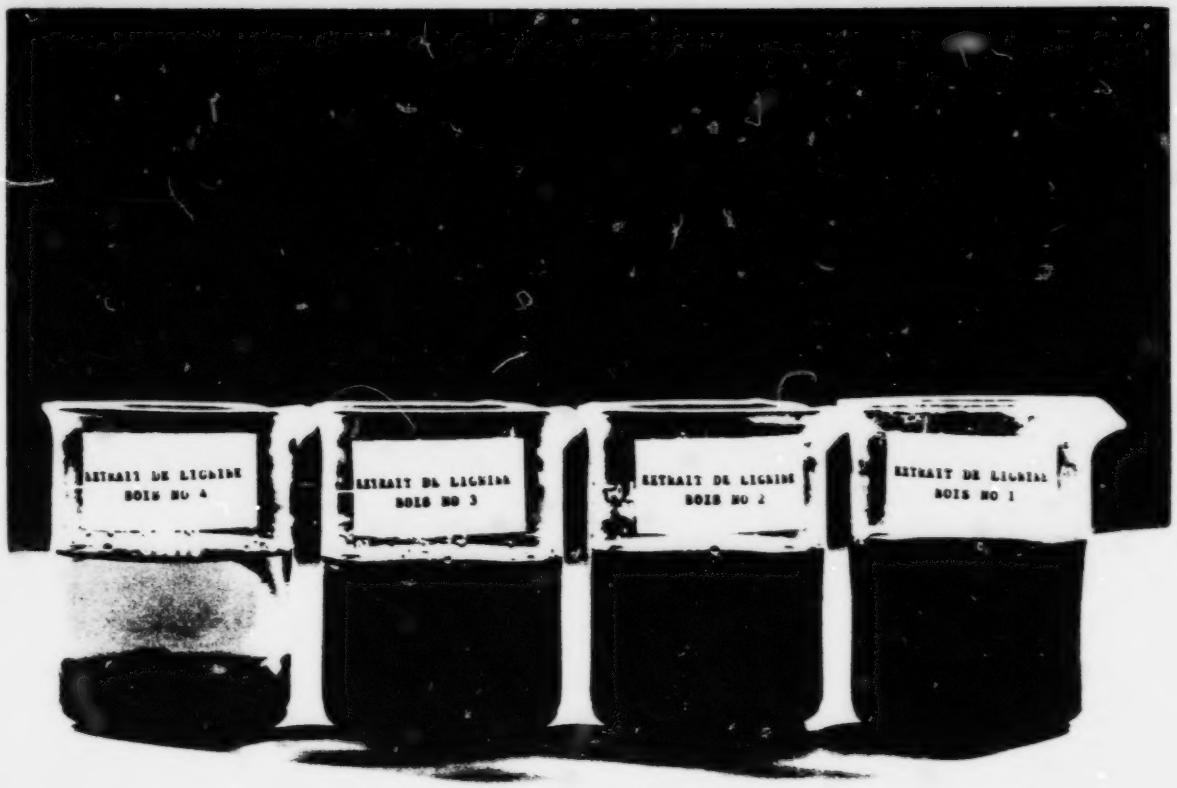


Figure 9: Montage utilisé pour l'extraction de la lignine des résidus prétraités après extraction des sucres solubles résiduels par l'eau chaude.



De gauche à droite: résidu no 4
résidu no 3
résidu no 2
résidu no 1

Figure 10: Concentrés de lignine obtenus après extraction de la lignine à partir des quatre substrats prétraités. Durant la concentration des extraits, une partie de la lignine précipita pour donner un précipité noirâtre.

CRIQ

3.6 Hydrolyse enzymatique des résidus

Le but de cette section du projet était d'effectuer l'hydrolyse enzymatique des quatre résidus obtenus après la double extraction de la lignine et séchage à l'air libre (voir Figure 11) afin d'obtenir des hydrolysats qui serviraient plus tard de substrats dans des fermentations. L'hydrolyse enzymatique de ces résidus fut précédée de tests préliminaires et de l'ajustement de certains paramètres.

3.6.1 Tests préliminaires

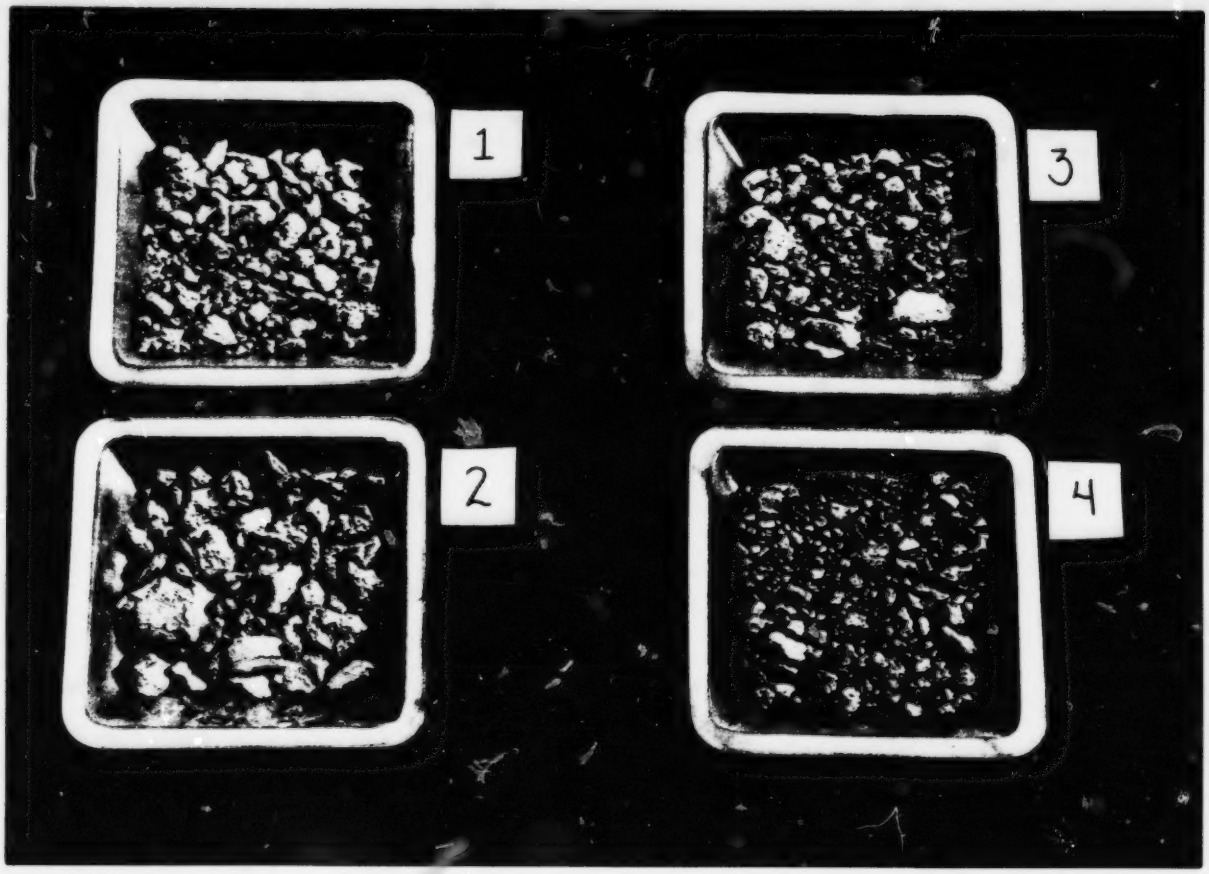
Nos tests préliminaires d'hydrolyse enzymatique furent basés sur le protocole mis au point par madame Eva Capek-Ménard de l'Université de Sherbrooke. Une première série de tests fut faite afin de vérifier les points suivants:

a) degré d'efficacité de l'hydrolyse enzymatique selon le protocole de l'Université de Sherbrooke. Hydrolyse enzymatique du résidu no 1 (voir Figure 11) et d'une cellulose hautement purifiée, soit la cellulose "Solka-Floc";

b) influence d'un doublement de la concentration des enzymes sur le degré d'hydrolyse enzymatique;

c) présence ou non de sucres solubles dans les deux préparations enzymatiques commerciales employées.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC



Résidu no	Résidu (code)
1	FPD-56
2	FPT-8
3	FPT-9
4	FPD-JG01

Figure 11: Apparence des résidus obtenus après la double extraction de la lignine et séchage à l'air libre.

La composition des différents mélanges réactionnels employés dans cette série de tests est donnée dans le Tableau IV. Ces hydrolyses furent faites dans des fioles Erlenmeyer de 250 mL (fermées par du papier d'aluminium) incubées à 50° C avec légère agitation (140 rpm, dans incubateur Psychrotherm de New Brunswick Sci.). De l'azoture de sodium (NaN_3) à 0,005% (p/v) était présent comme préservatif dans le tampon employé. Après 21,5, 28,5 et 48 heures d'incubation, un volume de 4 mL fut retiré de chaque fiole, centrifugé afin de sédimenter les fibres résiduelles, et le surnageant prélevé et placé au congélateur pour analyse ultérieure sur HPLC. Les résultats de ces analyses sont présentés au Tableau V avec quelques précisions concernant leur interprétation.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

TABLEAU IV

PREMIÈRE SÉRIE DE TESTS D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE: COMPOSITION DES MÉLANGES RÉACTIONNELS

MÉLANGE NO	TAMPON[1] (mL)	RÉSIDU[2] no 1 (g)	CELLULOSE[3] "SOLKA-FLOC" (g)	CELLUCLAST[4] (mL)	NOVOZYM 188[5] (mL)	pH (23° C DU MÉLANGE
2	100	---	2	11	0,1	5,27
3	100	---	2	22	0,2	5,16
4	100	2	---	11	0,1	5,08
5	100	2	---	22	0,2	4,98

1) Tampon= 0,05 M acide citrique pH 4,8 contenant 0,005% (p/v) d'azoture de sodium (NaN_3) comme préservatif.

2) Résidu no 1= fibres lignocellulosiques de l'échantillon no 1 après la double exraction de la lignine et séchage à l'air libre (voir Figure 11). L'échantillon fut d'abord broyé à la main dans un mortier de céramique avant son utilisation.

3) Cellulose "Solka-Floc"= type SW-40, obtenue de la James River Corporation (Berlin, New Hampshire).

4) Celluclast= source d'enzymes cellulolytiques; Celluclast 1,5 L de NOVO. D'après nos essais, cette préparation enzymatique contenait entre 23 et 25 unités "Filter-Paperase" par mL de solution originale.

5) Novozym 188= source d'enzyme β-glucosides (cellobiase), obtenue de NOVO, activité théorique: 282 (CBU/g).

CRIQ

TABLEAU V

RÉSULTATS DES PREMIERS TESTS PRÉLIMINAIRES D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE FIBRES CELLULOSIQUES (RÉFÉRENCE: TABLEAU IV)

MÉLANGE NO	FIBRE CELLULOSIQUE	CONCENTRATION (g/100 mL) DE GLUCOSE* APRÈS:			% D'HYDROLYSE OBTENU APRÈS 48 HEURES**
		21,5 h	28,5 h	48 h	
2	Solka-Floc SW-40	1,1	1,54	2,02	106,8%
3	Solka-Floc SW-40	0,98	1,39	1,50	87,1%
4	Résidu no 1	0,56	0,92	0,98	51,8%
5	Résidu no 1	0,54	0,89	0,95	55,2%

*: Le glucose était essentiellement le seul sucre véritablement produit en quantité appréciable durant l'hydrolyse enzymatique de la cellulose "Solka-Floc" ou du résidu no 1.

**: Dans ce calcul du pourcentage d'hydrolyse enzymatique après 48 heures, nous assumons que:

a) la cellulose "Solka-Floc" et le résidu no 1 ne consistent que de fibres cellulosiques;

b) que l'hydrolyse complète de 2 g de telles fibres donnera 2,10 g de glucose.

Conditions d'hydrolyse: 50° C, 140 rpm.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

Les conclusions suivantes peuvent êtres tirées de ces tests préliminaires:

1) la cellulose "Solka-Floc" fut presque complètement hydrolysée par le "cocktail" d'enzymes cellulolytiques employé; cela se voyait déjà à l'oeil nu;

2) les fibres cellulosiques présentes dans le résidu no 1 ne furent que partiellement hydrolysées. Les pourcentages d'hydrolyse après 48 heures furent de 51,8 et 55,2%. Toutefois, puisque ce résidu en réalité contenait aussi une certaine proportion de lignine et peut-être d'hémicelluloses, il est probable que les pourcentages d'hydrolyse des fibres cellulosiques étaient véritablement supérieurs à ceux donnés dans le Tableau V;

3) l'efficacité d'hydrolyse ne fut pas supérieure lorsque les quantités d'enzymes cellulolytiques furent doublées (voir les résultats pour les mélanges réactionnels 3 et 5).

Comme preuve du succès appréciable de nos premiers tests d'hydrolyse enzymatique, nous présentons aux Figures 12 et 13 les résultats d'analyse, par chromatographie liquide sous haute pression ("HPLC"), des mélanges de sucres solubles obtenus des deux échantillons de fibres après une hydrolyse enzymatique de 48 heures.

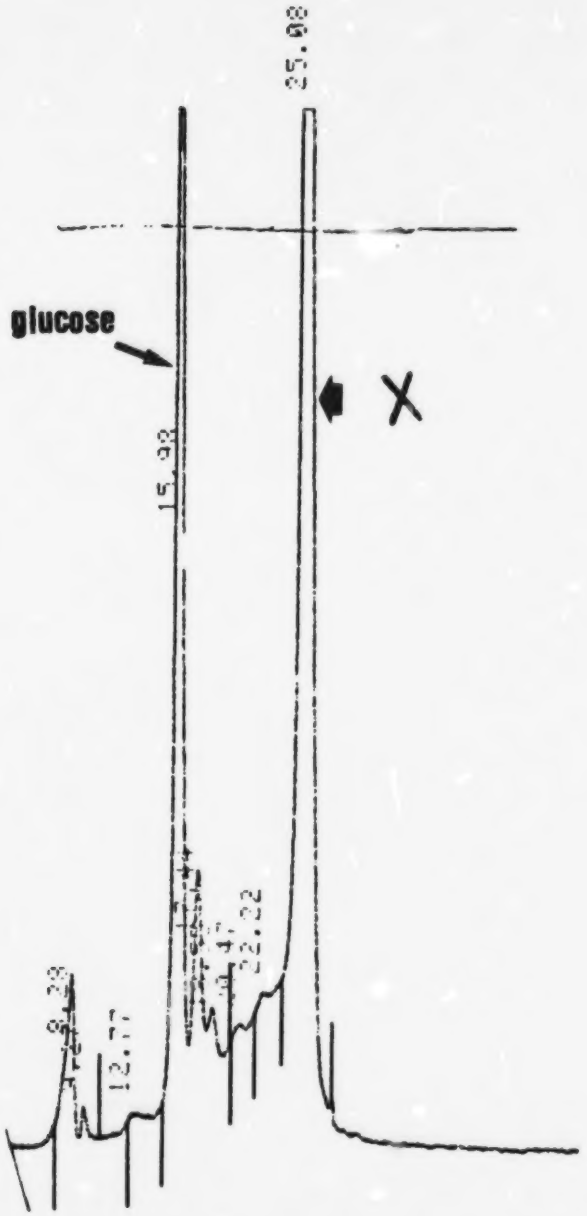


Figure 12: Analyse par chromatographie liquide sous haute pression, du mélange de sucres solubles obtenus après hydrolyse enzymatique de la cellulose "Solka-Floc" pendant 48 heures. Référence: Tableau IV, mélange no 2, Tableau V, mélange no 2.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

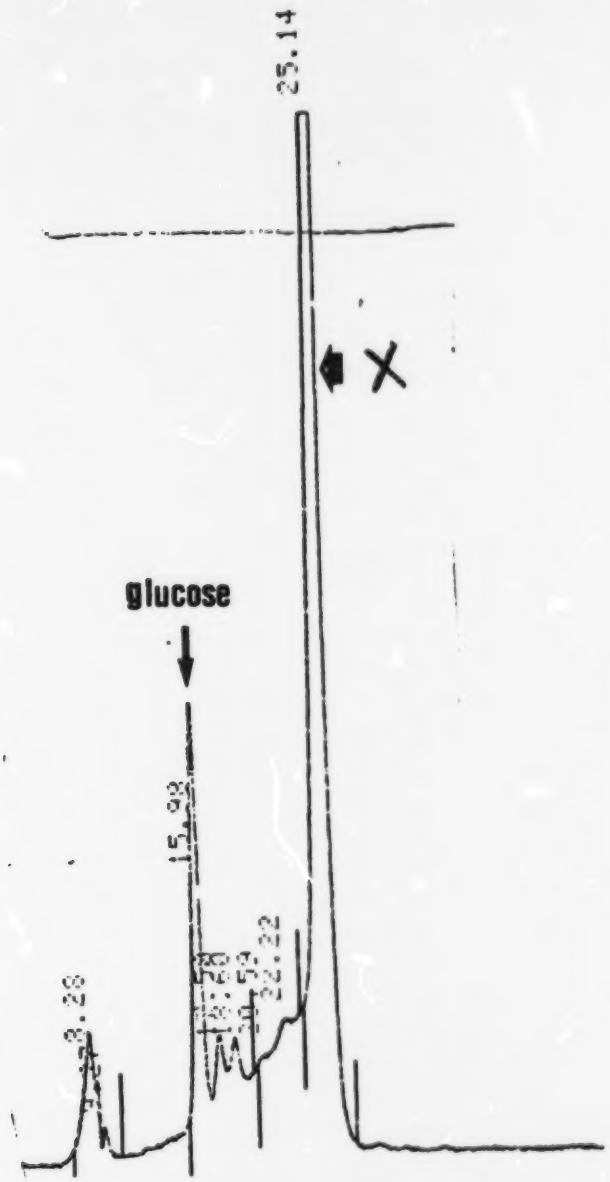


Figure 13: Analyse par chromatographie liquide sous haute pression, du mélange de sucres solubles obtenus après hydrolyse enzymatique des fibres cellulosiques du résidu no 1 pendant 48 heures. Référence: Tableau IV, mélange no 4 et Tableau V, mélange no 4.

CRIQ

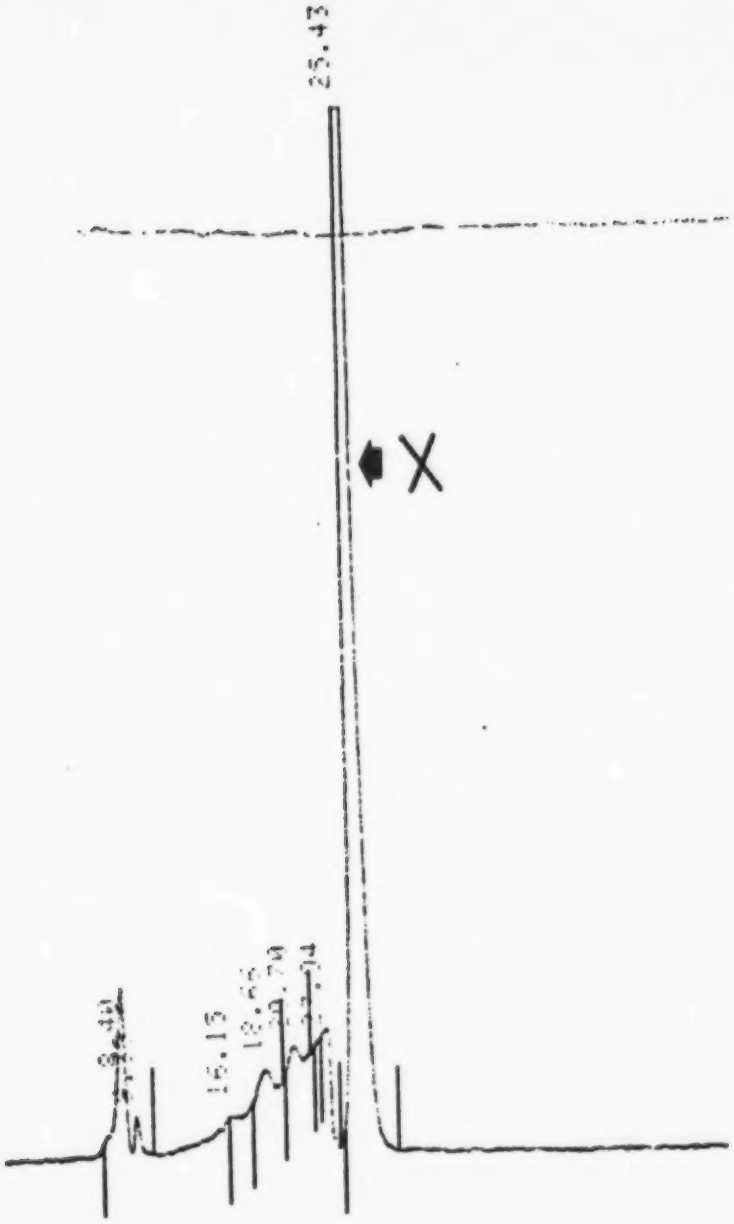


Figure 14: Analyse par chromatographie liquide sous haute pression, de la préparation commerciale d'enzymes cellulolytiques Celluclast 1,5 L après dilution (1/10) appropriée. Le pic "X" présent dans les deux chromatogrammes précédents (Figures 12 et 13) origine donc bien de la préparation Celluclast 1,5 L de NOVO.

CRIQ

Le pic "X" présent sur les deux chromatogrammes présentés aux Figures 12 et 13, et éluant avec un temps de rétention de 25,08 à 25,14 minutes, n'originait pas d'une substance produite durant l'hydrolyse enzymatique mais plutôt d'une substance présente dans la préparation d'enzymes cellulolytiques Celluclast 1,5 L utilisée, tel que démontré à la Figure 14.

Des tests préliminaires d'hydrolyse enzymatique furent aussi effectués avec les trois autres résidus lignocellulosiques en notre possession, c'est-à-dire les résidus nos 2, 3 et 4. Tous les résidus furent moulus à la main dans un mortier de céramique et le mélange réactionnel était identique à celui décrit au Tableau IV pour le mélange no 4 sauf pour l'identité du résidu. Comme précédemment, l'hydrolyse enzymatique fut faite à 50° C avec une légère agitation (140 rpm) mais, cette fois-ci, l'hydrolyse fut poursuivie jusqu'à 72 heures. L'hydrolyse de la cellulose "Solka-Floc" fut encore une fois employée comme hydrolyse-contrôle. Les résultats de ces tests préliminaires ne seront pas présentés ici, dans un but de brièveté. Avec les trois résidus en notre possession, le pourcentage d'efficacité de l'hydrolyse enzymatique après 72 heures varia de 38 à 43%, ce qui est sensiblement inférieur au résultat obtenu (51,8% après 48 heures) avec le résidu no 1 (voir Tableau V, mélange no 4). Tel que mentionné plus tôt dans le cas de l'hydrolyse du résidu no 1, le pourcentage d'efficacité de l'hydrolyse enzymatique des fibres cellulosiques des trois résidus est très certainement sousestimé dû à la présence de lignine et probablement d'hémicelluloses

CRIQ

dans les échantillons, laquelle nous fait surestimer la concentration en fibres cellulosiques des résidus et par le fait même sous-estimer l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique.

Comme dernier test préliminaire, nous avons déterminé l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique lorsque la moitié (5,6 mL) de la quantité habituelle (11 mL) de l'enzyme Celluclast 1,5 L était employée, la concentration de l'enzyme Novozym 188 restant la même. Pour ces tests, le résidu no 1 fut utilisé comme substrat. Les résultats après 48 et 72 heures d'hydrolyse à 50° C démontrèrent qu'il n'y avait pas de différence notable dans l'efficacité d'hydrolyse avec ces deux concentrations de l'enzyme. Cette observation était très intéressante puisqu'elle permettra des économies appréciables d'enzyme Celluclast, une enzyme assez dispendieuse.

3.6.2 Hydrolyse enzymatique des résidus lignocellulosiques

Les résultats de nos tests préliminaires d'hydrolyse nous permirent de mettre au point un protocole sensiblement différent de celui originalement fourni par les chercheurs de l'Université de Sherbrooke pour effectuer l'hydrolyse enzymatique des quatre résidus lignocellulosiques en notre possession. Ce protocole peut être décrit comme suit:

CRIQ

a) l'hydrolyse enzymatique de chacun des résidus sera faite en deux étapes, employant à chaque étape la moitié de la quantité habituelle de l'enzyme Celluclast; cette quantité réduite d'enzyme n'empêche pas d'atteindre un degré d'hydrolyse aussi élevé que celui fourni par la quantité habituelle d'enzyme, tel que démontré dans des tests préliminaires. De plus, l'hydrolyse en deux étapes plutôt qu'une a le potentiel de produire un plus fort degré d'hydrolyse enzymatique en réduisant les risques d'inhibition par le ou les produit(s) d'hydrolyse;

b) la durée de chacune des deux étapes d'hydrolyse sera de 60 heures à 50° C;

c) contrairement aux tests préliminaires, les mélanges réactionnels ici ne contiendront pas d'azoture de sodium (NaN_3), un agent antimicrobien, ceci afin de ne pas inhiber la croissance des microorganismes lors de la fermentation ultérieure des hydrolysats produits ici.

Le protocole d'hydrolyse enzymatique des résidus est décrit plus précisément dans l'Annexe B.3. Dans chaque expérience d'hydrolyse, l'hydrolyse enzymatique de la cellulose "Solka-Floc" sera aussi effectuée et agira comme hydrolyse-contrôle.

Les résultats enzymatiques des quatre résidus lignocellulosiques sont introduits dans le Tableau VI. Les observations suivantes furent faites:

CRIQ

TABLEAU VI

HYDROLYSE ENZYMATIQUE EN DEUX ÉTAPES[1] DES QUATRE RÉSIDUS LIGNOCELLULOSIQUES ET DE LA CELLULOSE "SOLKA-FLOC"

ÉCHANTILLON	ÉTAPE NO	GLUCOSE[3] (g/100 mL) APRÈS 60 h (g)	% D'HYDROLYSE[4] APRÈS 60 h	% D'HYDROLYSE CUMULATIF
Résidu no 1	1	0,67	35,3	
	2	0,48	25,3	60,6
Cellulose "Solka-Floc"	1	1,23	64,9	
	2	0,11	5,8	70,7
Résidu no 2	1	0,74	39,0	
	2	0,46	24,3	63,3
Cellulose[2] "Solka-Floc"	1	1,17	61,7	
	2	0,37	19,5	81,2
Résidu no 3	1	0,69	36,4	
	2	0,53	28,0	64,4
Cellulose "Solka-Floc"	1	1,25	66,0	
	2	0,47	24,8	90,8
Résidu no 4	1	0,57	30,0	
	2	0,49	25,8	55,8
Cellulose "Solka-Floc"	1	1,55	81,8	
	2	0,47	24,8	106,6

1) Voir Annexe B.3 pour les détails de l'hydrolyse enzymatique. Hydrolyse à 50° C avec légère agitation (180 rpm). Contrairement aux tests préliminaires, les mélanges réactionnels ne contenaient pas d'azoture de sodium (NaN_3) comme préservatif.

2) Une hydrolyse enzymatique contrôle de la cellulose "Solka-Floc" fut faite chaque fois.

3) Glucose produit (et mesuré par "HPLC") à partir d'une concentration en résidu ou en cellulose "Solka-Floc" de 1,8 g/100 mL.

4) Calculé en assumant que 1 g de cellulose sera converti en 1,05 g de glucose après hydrolyse complète et que les substrats employés (résidus et cellulose "Solka-Floc") ne consistaient que de cellulose.

CRIQ

a) encore une fois, le glucose était essentiellement le seul sucre produit durant l'hydrolyse enzymatique, bien que des petites quantités d'une autre substance (probablement le xylose) aient aussi été détectées. Pour cette raison, l'efficacité de l'hydrolyse sera évaluée sur la base de la quantité de glucose obtenu après hydrolyse;

b) avec les quatre résidus en notre possession, l'hydrolyse en deux étapes, employant à chaque fois la moitié de la quantité usuelle de l'enzyme Celluclast 1,5 L, donna des pourcentages d'hydrolyse cumulatifs supérieurs à ceux observés précédemment dans nos tests préliminaires pour des hydrolyses faites en une seule étape et employant la quantité usuelle de Celluclast 1,5 L. Avec une hydrolyse en deux étapes, les pourcentages cumulatifs d'hydrolyse varièrent de 55,8 à 64,4% alors qu'ils ne dépassèrent jamais 55,2% avec une hydrolyse en une seule étape, se situant plutôt autour de 37 à 45%;

c) avec tous les substrats utilisés, l'hydrolyse enzymatique fut plus efficace lors de la première étape d'hydrolyse et ceci est encore plus vrai dans le cas des hydrolyses de la cellulose "Solka-Floc". Ce phénomène peut être expliqué par une limitation dans la quantité de fibres cellulosiques accessibles lors de la seconde étape d'hydrolyse ou encore par une plus grande difficulté d'hydrolyse de la cellulose résiduelle.

CRIQ

Comme preuve du succès appréciable de l'hydrolyse enzymatique, nous présentons aux Figures 15 et 16 une copie des chromatogrammes obtenus après analyse, dans un chromatographe liquide sous haute pression, des sucres solubles produits durant l'hydrolyse. Ici, seuls les chromatogrammes pour l'étape no 1 d'hydrolyse seront présentés. On peut effectivement noter que seul le glucose était produit en quantité appréciable durant l'hydrolyse enzymatique. Les pics A et B observés sur chacun des chromatogrammes étaient pour des substances présentes dans la préparation de l'enzyme Celluclast 1,5 L.

3.6.3 Concentration et entreposage des sucres solubles obtenus après l'hydrolyse enzymatique des résidus

Pour chacun des résidus, les deux extraits de sucres solubles après hydrolyse enzymatique en deux étapes de chacun des résidus, et récupérés après centrifugation des hydrolysats, furent combinés et concentrés à 70-75° C sous vide partiel dans un gros "rotavapor" Büchi jusqu'à un volume final de 3,0 à 3,2 L. Ces concentrés furent alors placés au congélateur et seront utilisés plus tard dans des tests de fermentescibilité.

CRIQ

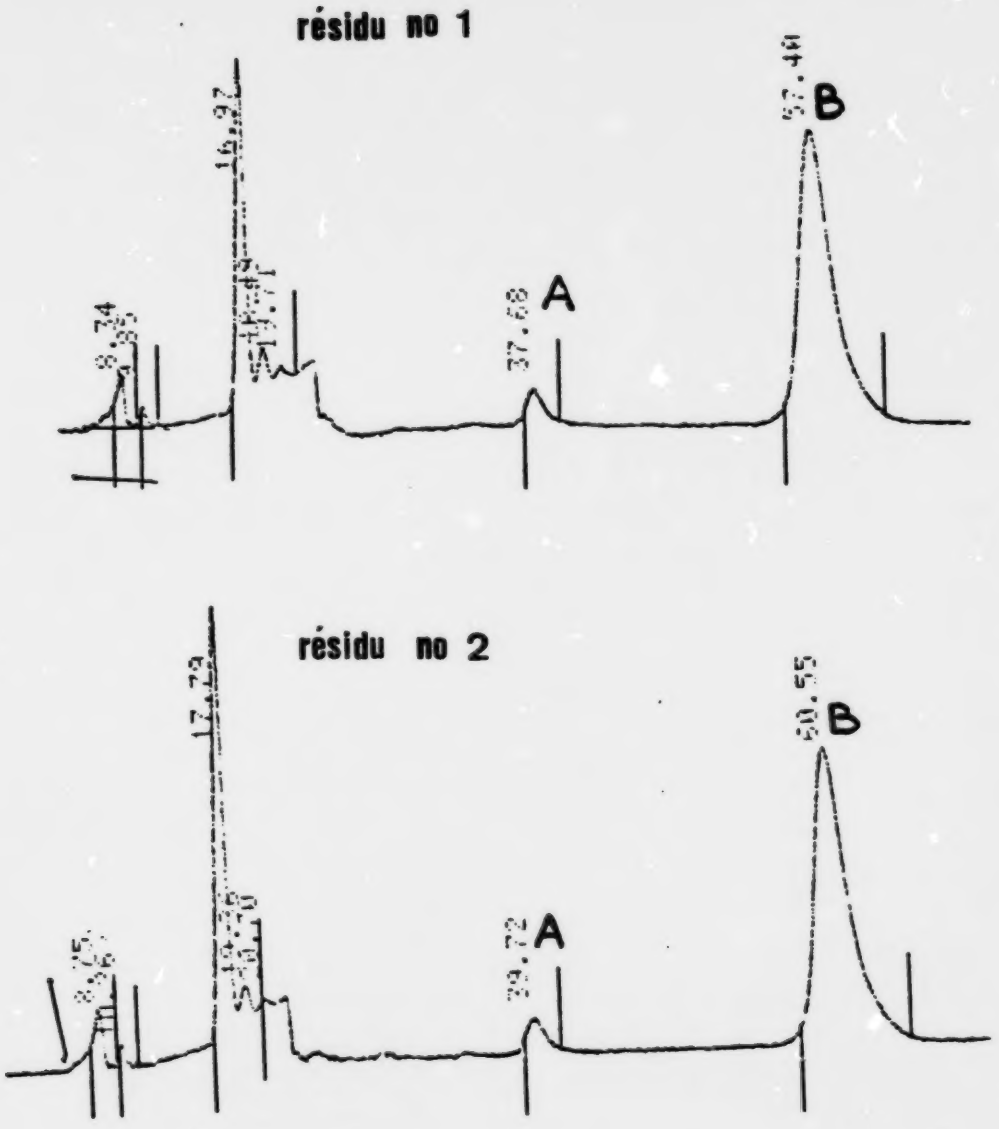


Figure 15: Analyse, par chromatographie liquide sous haute pression, des sucres solubles produits durant l'étape no 1 de l'hydrolyse enzymatique des résidus nos 1 et 2. Référence: Tableau VI. Les pics A et B représentent des substances présentes dans la préparation de l'enzyme Celluclast 1,5 L.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

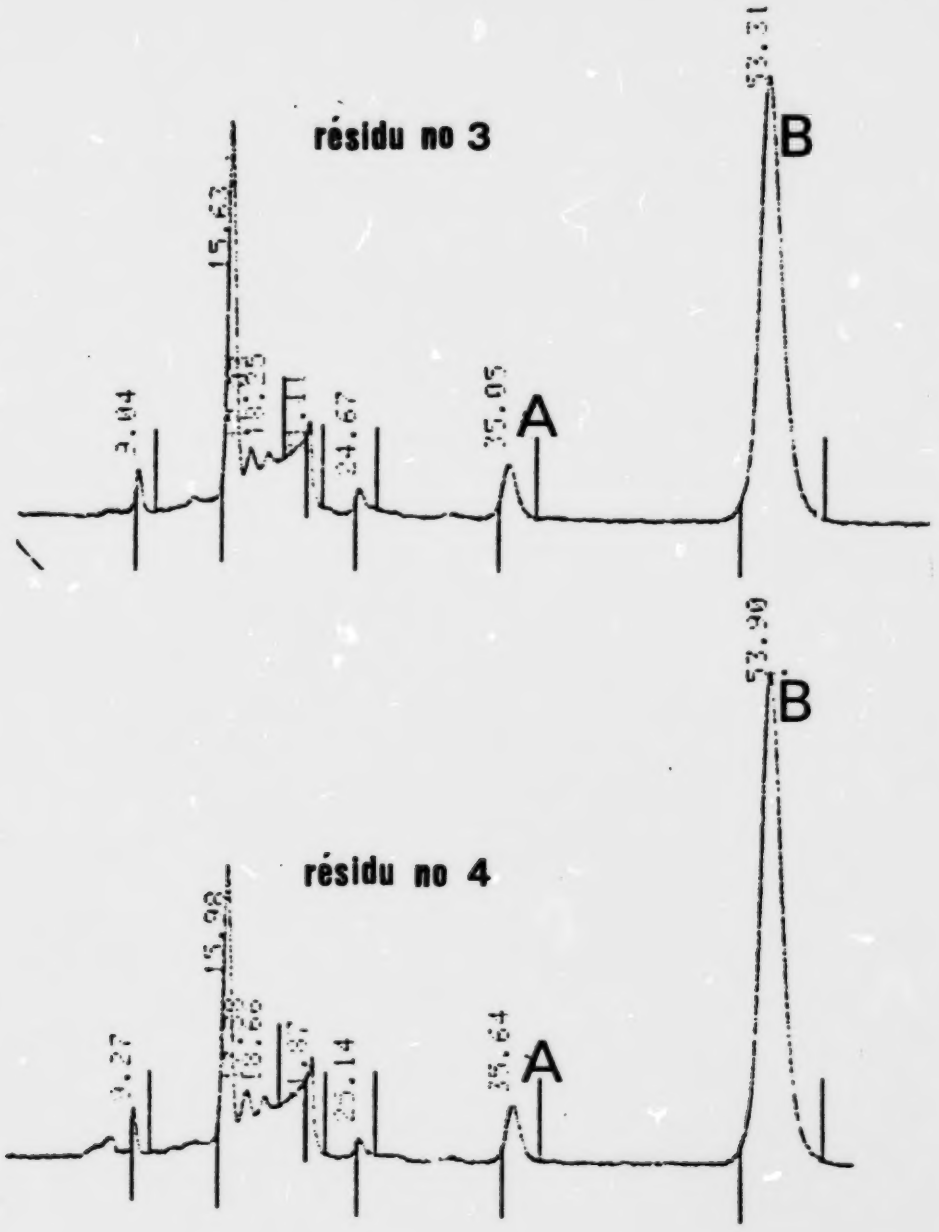


Figure 16: Analyse, par chromatographie liquide sous haute pression, des sucres solubles produits durant l'étape no 1 de l'hydrolyse enzymatique des résidus nos 3 et 4. Référence: Tableau VI. Les pics A et B représentent des substances présentes dans la préparation de l'enzyme Celluclast 1,5 L.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

3.6.4 Traitement des résidus après la double hydrolyse enzymatique

Les résidus obtenus après la double hydrolyse enzymatique et récupérés par centrifugation furent d'abord entreposés au congélateur. Par la suite, ceux-ci furent placés dans un incubateur à 40-50° C pendant 36 heures puis placés à l'air ambiant pour séchage. Finalement, les résidus furent expédiés à Line Jaulin (Université de Sherbrooke) pour analyse.

3.7 Hydrolyse enzymatique des oligosaccharides présents dans les concentrés de sucres solubles extraits des différents bois prétraités

Nous parlons ici des concentrés de sucres solubles extraits de différents bois prétraités lors du prétraitement et aussi par extraction à l'eau chaude dans un SOXHLET à recirculation. La préparation de ces concentrés est décrite dans la section 3.3 de ce rapport et certaines données sur ces concentrés sont fournies dans le Tableau III. L'analyse de ces concentrés, par chromatographie liquide sous haute pression, a révélé que les sucres solubles présents dans ces concentrés consistaient probablement en des oligosaccharides dérivés présumément de la cellulose et des hémicelluloses (voir section 3.4 et les Figures 5 à 8). On détecta peu de sucres simples dans ces concentrés. Il était donc nécessaire d'effectuer l'hydrolyse de ces oligosaccharides en sucres plus

simples avant d'en faire la fermentation. A cet effet, l'hydrolyse enzymatique fut sélectionnée. La source d'enzymes pour cette hydrolyse fut la même préparation d'enzymes cellulolytiques Celluclast 1,5 L de NOVO, utilisée précédemment, sur la base que les préparations d'enzymes cellulolytiques peu purifiées contiennent presque toujours des enzymes capables de dégrader les hémicelluloses (ou xylans).

3.7.1 Tests préliminaires

Des tests préliminaires furent d'abord fait en utilisant une préparation commerciale de xylan (le xylan de mélèze obtenu de chez Sigma) et le concentré de sucres solubles obtenu du résidu no 1 comme substrats. On trouvera au Tableau VII la composition des divers mélanges réactionnels employés pour ces tests. L'hydrolyse enzymatique fut effectuée à 50° C avec légère agitation (180 rpm) pendant 0 à 48 heures. Durant l'hydrolyse, des échantillons (4 mL) furent prélevés, centrifugés dans le cas du xylan de mélèze et les surnageants analysés dans un chromatographe liquide sous haute pression. Les résultats obtenus avec le concentré no 1, après 9,15 heures d'hydrolyse, montrèrent (Figure 17) que les oligosaccharides originairement présents dans ce concentré (voir Figure 5) avaient été convertis presque uniquement en xylose (Figure 17). Cela montre clairement que les oligosaccharides présents dans ce concentré étaient bien

CRIQ

dérivés des hémicelluloses (xylans). Une concentration de 1,63% (p/v) en xylose fut détectée. Ce résultat fut obtenu avec la plus petite des deux concentrations d'enzymes utilisées. Quant au xylan de mélèze, les résultats démontrèrent que celui-ci pouvait aussi être hydrolysé en xylose (Figure 18); après 9,15 heures d'hydrolyse, on estima qu'environ 38% du xylan de mélèze avait été converti en xylose; ce pourcentage augmenta à 50% après 48 heures d'hydrolyse.

3.8 Fermentescibilité des sucres obtenus par hydrolyse enzymatique

L'objectif de cette section des travaux est d'évaluer la fermentescibilité des sucres solubles obtenus de nos travaux d'hydrolyse enzymatique (voir les sections 3.6 et 3.7 de ce rapport). Le degré de conversion de ces sucres en éthanol sera notre critère d'évaluation de la fermentescibilité. Trois microorganismes furent sélectionnés pour cette étude, ceux-ci sont: Pachysolen tannophilus ATCC 32691 (NRRL Y2460), Zymomonas mobilis ATCC 10988 et Saccharomyces cerevisiae no 1116 (produit par la compagnie Lallemand Inc., Montréal).

TABLEAU VII

COMPOSITION DES DIVERS MÉLANGES RÉACTIONNELS EMPLOYÉS DANS LES TESTS PRÉLIMINAIRES D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES OLIGOSACCHARIDES PRÉSENTS DANS LES CONCENTRÉS DE SUCRES SOLUBLES

MÉLANGE NO	TAMPON (3) (mL)	H_2O (mL)	XYLAN DE MÉLÈZE (1) (g)	CONCENTRÉ NO 1 (2) (mL)	CELLUCLAST 1,5 L (4) (mL)
(a)	5,0	50	2	----	5,5
1	5,0	----	----	50	5,5
3	5,0	2,8	----	50	2,8

1) Obtenu de chez Sigma.

2) Pour sa préparation, voir les sections 3,3 et 3,4 de ce rapport ainsi que le Tableau III et la Figure 5.

3) Tampon= 0,5 M Citrate pH 4,8.

4) Celluclast 1,5 L= source d'enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques obtenue de chez NOVO. Cette préparation enzymatique contenait 28,5 unités d'activité "Filter-Paperase" par mL.

CONDITIONS D'HYDROLYSE: 50° C
180 rpm
pendant 0 à 48 h

CRIQ

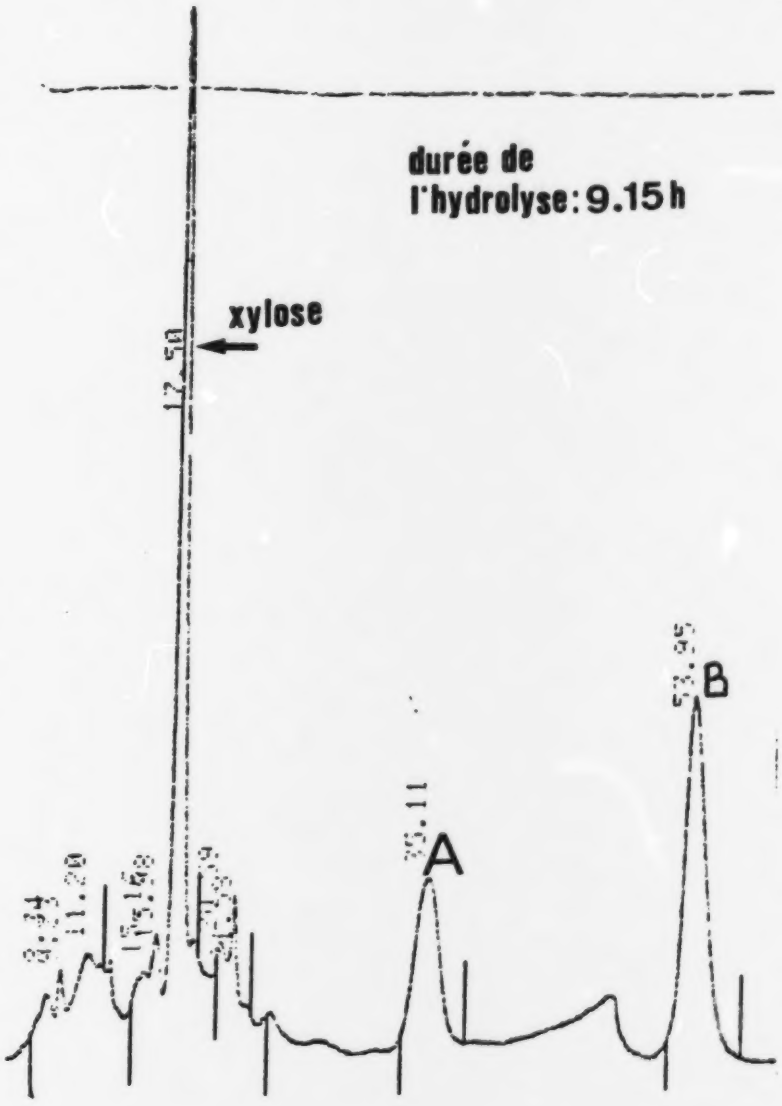


Figure 17: Analyse, par chromatographie liquide sous haute pression, des sucres solubles obtenus après hydrolyse enzymatique des oligosaccharides présents dans le concentré des sucres solubles dérivé du résidu no 1. Référence: Tableau VII, mélange no 3. Les oligosaccharides originairement présents dans ce concentré éluaient avec un temps de rétention de 9,0 à 9,5 minutes.

Note: Les pics A et B représentent des substances présentes dans la préparation d'enzyme Celluclast 1,5 L.

CRIQ

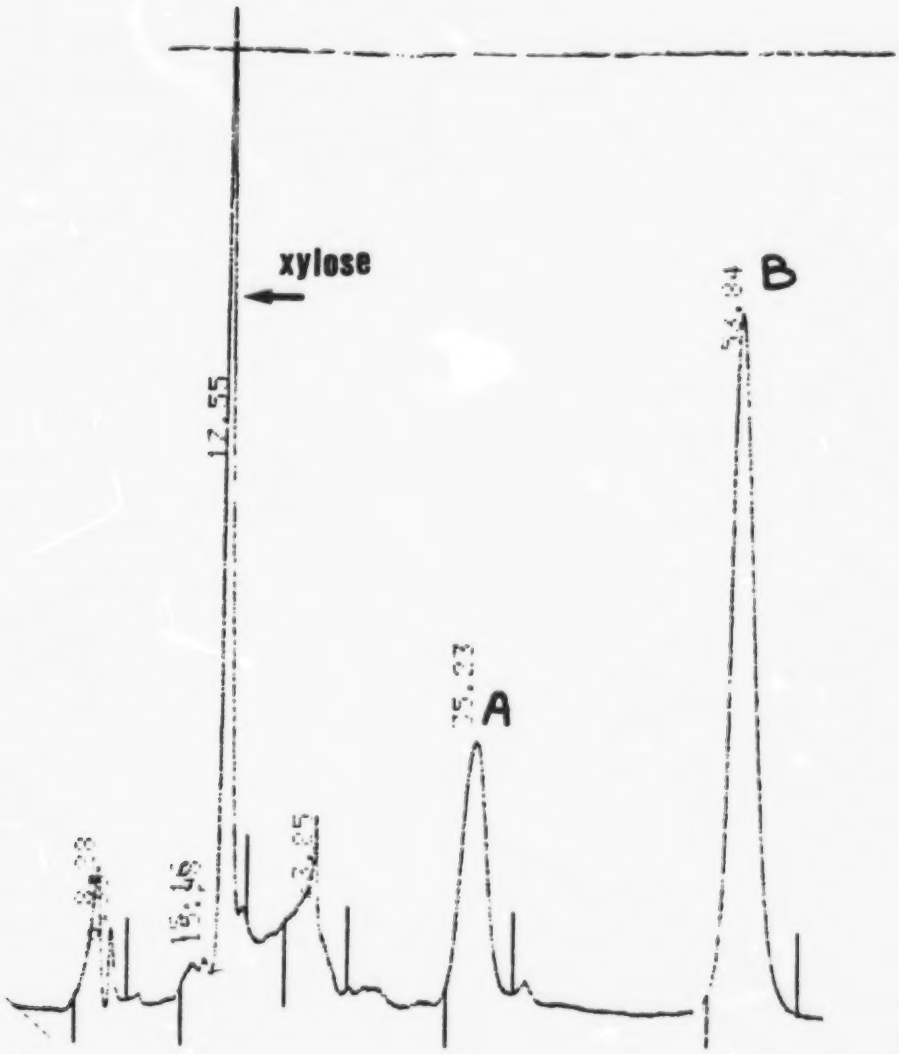


Figure 18: Analyse, par chromatographie liquide sous haute pression, des sucres solubles obtenus après hydrolyse enzymatique du xylan de mélèze. Référence: Tableau VII, mélange (a).

Note: Les pics A et B représentent des substances présentes dans la préparation d'enzyme Celluclast 1,5 L.

CRIQ

3.8.1 Fermentations préliminaires employant des sucres purs

Chacun des microorganismes listés plus haut fut évalué quant à sa capacité de fermenter les trois bouillons suivants:

- 4% (p/v) glucose;
- 4% (p/v) xylose;
- 2% (p/v) glucose + 2% (p/v) xylose.

Ces travaux furent faits en petits fermenteurs de 2 L (fermenteurs Mulltigen de New Brunswich Sci.) avec contrôle du pH et employant le milieu de culture de base approprié pour chacun des microorganismes. On trouvera à la Figure 19 une photo du montage utilisé pour ces études. De plus, tous les détails de ces travaux (milieux de culture, préparation de l'inoculum, méthodes d'analyses, etc.) sont présentés à l'Annexe C.

3.8.1.1 Résultats avec Pachysolen tannophilus

Avec Pachysolen tannophilus ATCC 32691, la fermentation des sucres purs se fit aux conditions suivantes:

- aération: 0,67 vvm;
- agitation 200 rpm;
- température: 28° C;
- pH: 4,7 $\pm$ 0,2.

Les résultats de ces expériences sont présentés dans les Figures 20 à 22. Les observations suivantes furent faites:

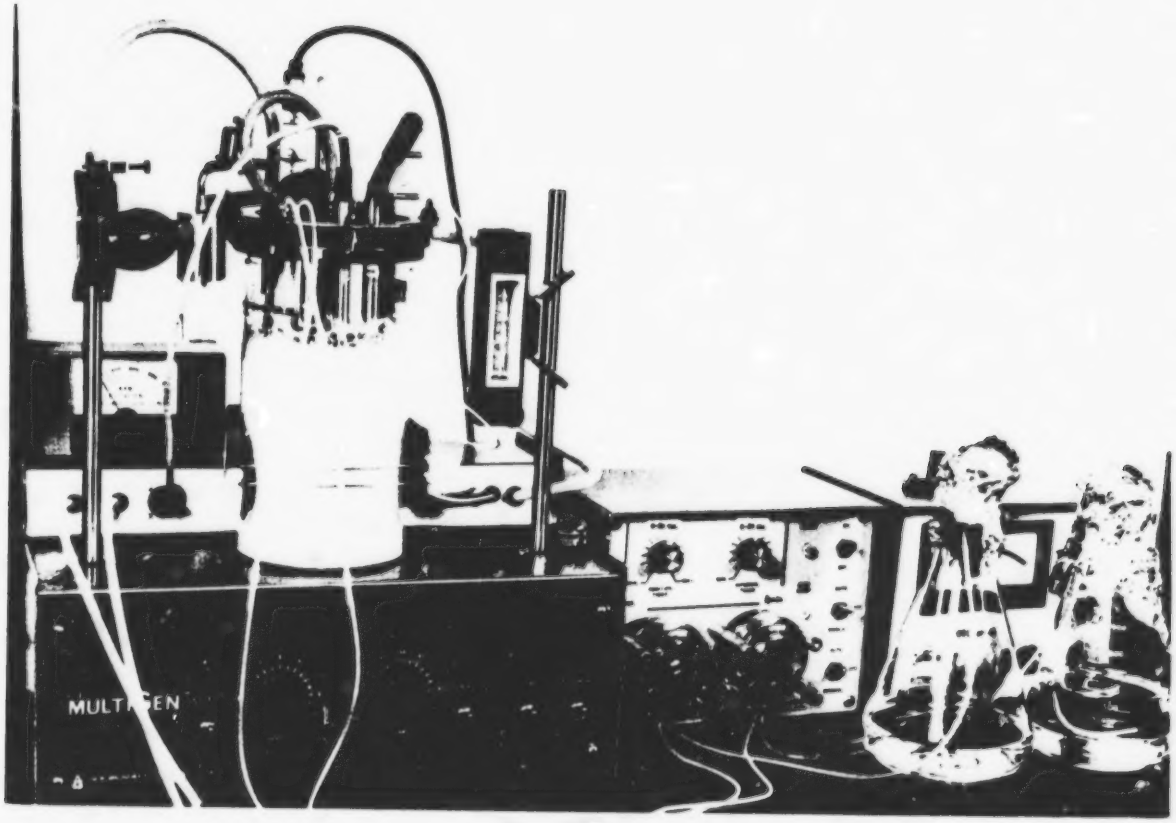


Figure 19: Montage utilisé pour les fermentations préliminaires employant des sucres purs.

Paramètres contrôlés: agitation, température, aération et pH. Le pH fut contrôlé par l'ajout requis de NaOH 1N ou de HCl 0,1 N stérilisé dans l'autoclave. L'excès de mousse fut contrôlé manuellement par l'ajout de quelques gouttes d'antimousse type A (Sigma, no A-5758).

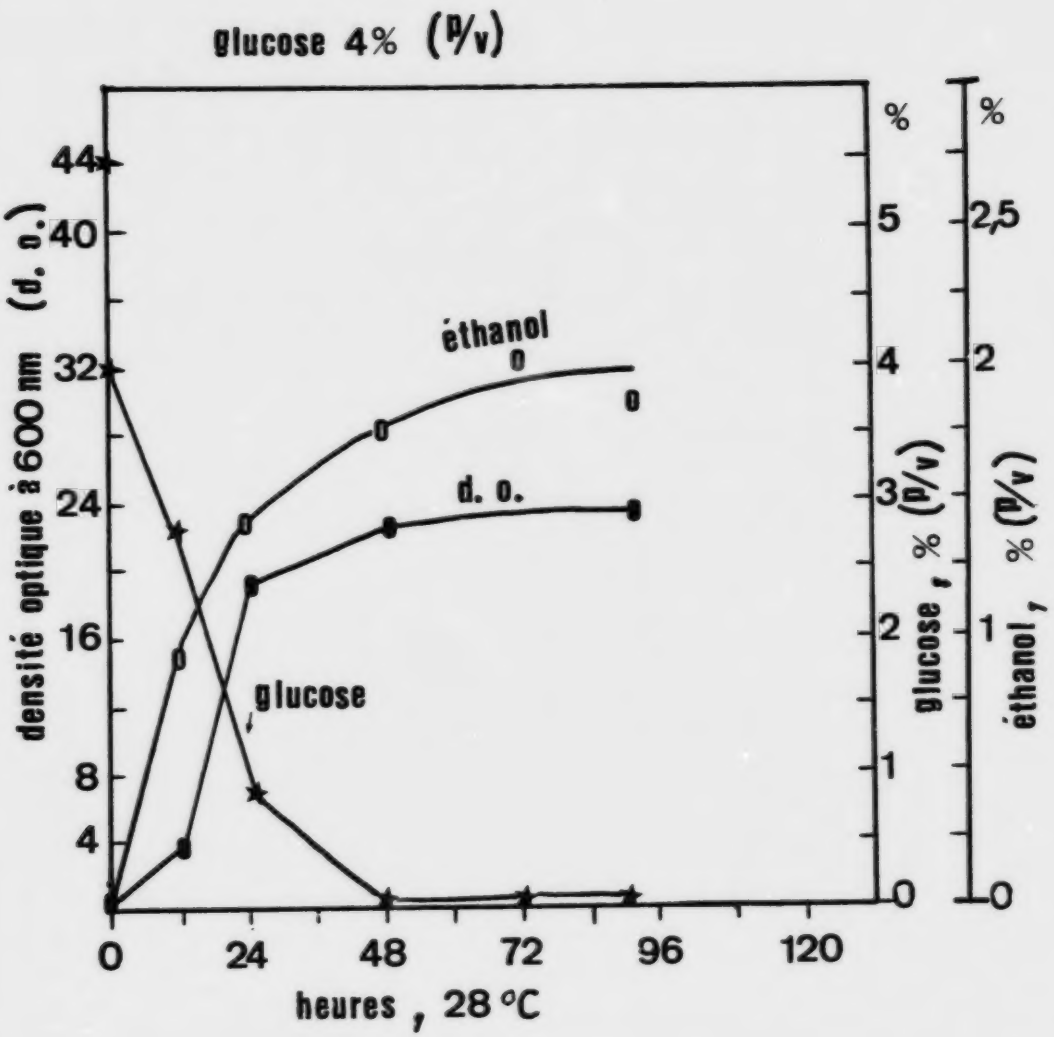


Figure 20: Fermentation d'un bouillon glucose 4% (p/v) par Pachysolen tannophilus ATCC 32691. Un inoculum de 10% (v/v) ayant une densité optique (D.O.) de 12,18 fut employé.

Conditions d'opération: aération: 0,67 vvm
agitation: 200 rpm
T°: 28° C
pH: 4,7 ± 0,2

CRIQ

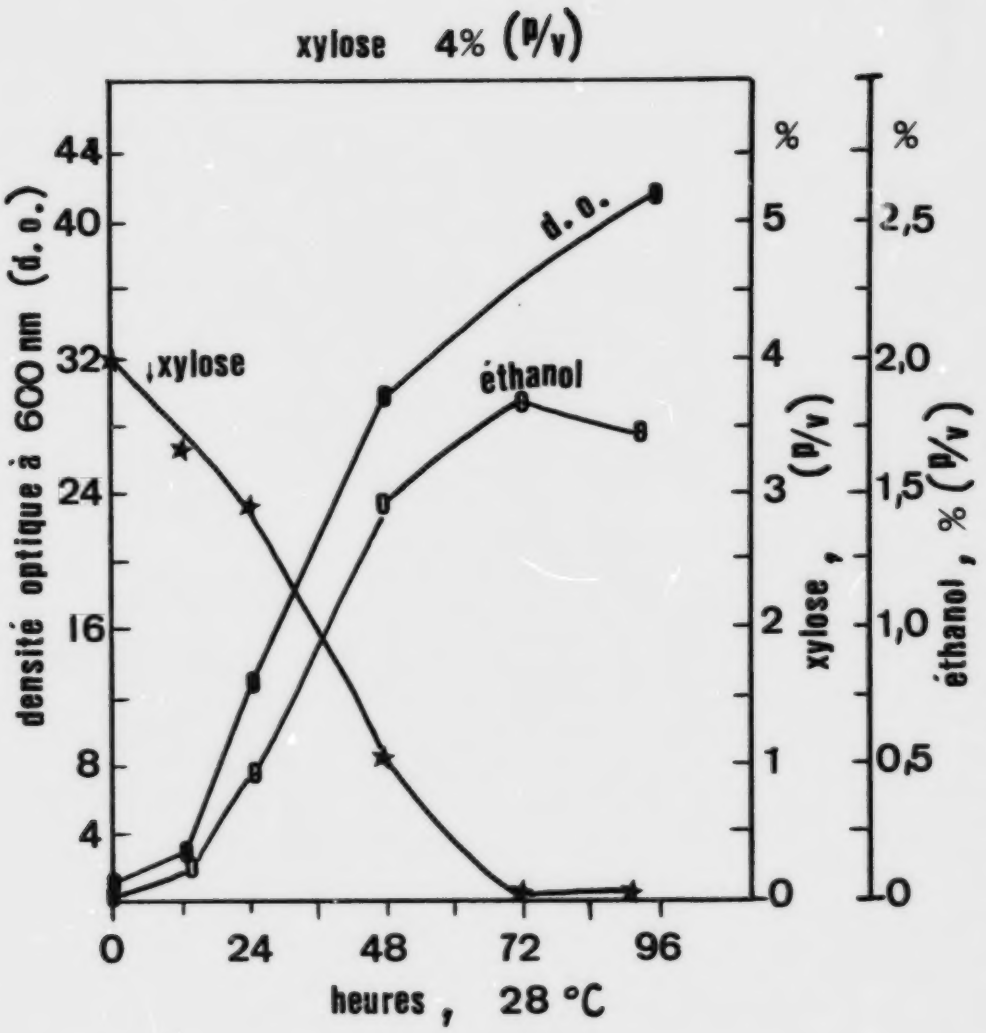


Figure 21: Fermentation d'un bouillon xylose 4% (p/v) par Pachhysolen tannophilus ATCC 32691. Un inoculum de 10% (v/v) avec une densité optique (D.O.) de 10,86 fut employé.

Conditions d'opération:	aération:	0,67 vvm
	agitation:	200 rpm
	T°:	28° C
	pH:	4,7 ± 0,2

CRIQ

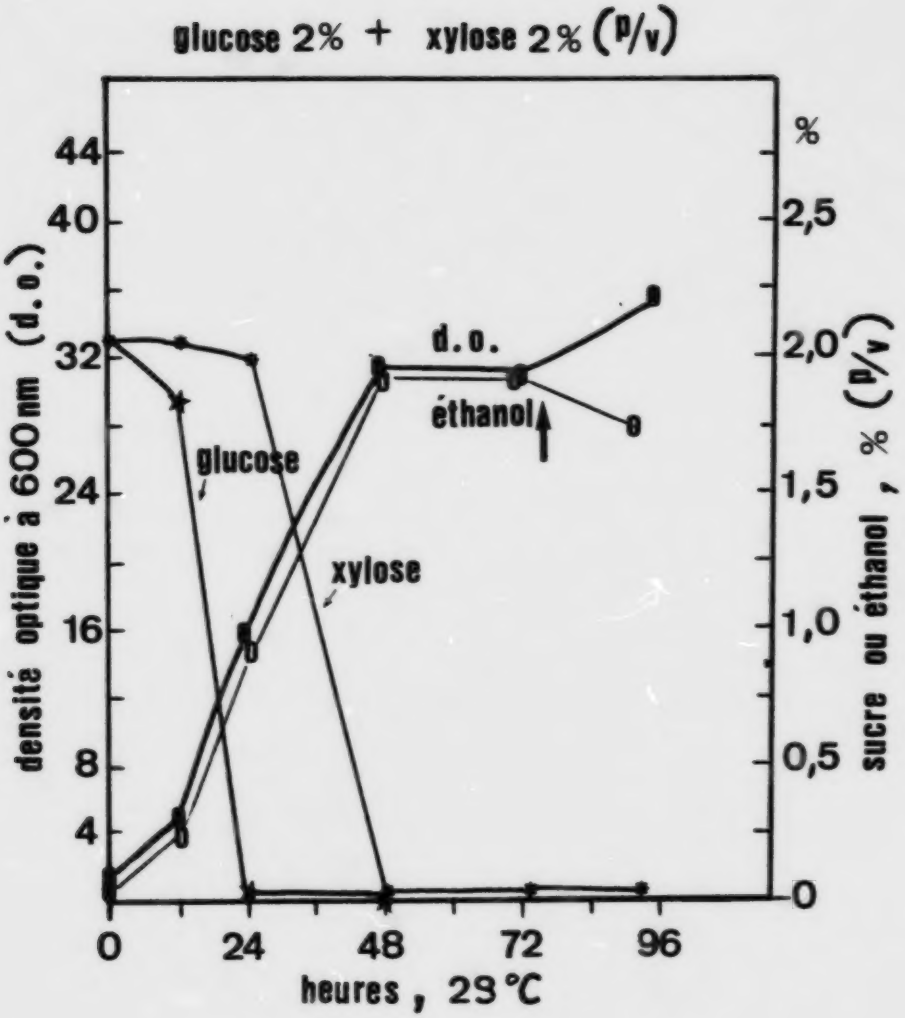


Figure 22: Fermentation d'un bouillon glucose 2% (p/v) + xylose 2% (p/v) par Pachysolen tannophilus ATCC 32691. Un inoculum de 10% (v/v) ayant une densité optique de 10,83 fut employé.

Conditions d'opération:

aération:	0,67 vvm
agitation:	200 rpm
T°:	28° C
pH:	4,7 ± 0,2

CRIQ

a) Pachysolen tannophilus ATCC 32691 fermente facilement le glucose et le xylose, du moins dans les conditions employées lors de cette étude. Le glucose est plus rapidement métabolisé que le xylose lorsque le milieu contient un mélange égal (p/p) de ces deux sucres (Figure 22). La consommation du xylose ne commenca qu'une fois que tout le glucose avait été métabolisé;

b) la production d'éthanol à partir de ces sucres purs était très appréciable, étant environ 18-19 g/L d'éthanol à partir de 38-42 g/L de sucre. Avec les trois fermentations, la concentration de l'éthanol baissa légèrement après 72 heures, sans doute le résultat d'un début de consommation de l'éthanol par les cellules en condition aérobie.

Pachysolen tannophilus est donc une levure très intéressante car elle possède le potentiel de fermenter les deux sucres majeurs (glucose et xylose) présents dans les fractions cellulose et hémicellulose du bois.

3.8.1.2 Résultats avec Saccharomyces cerevisiae

Les conditions suivantes furent employées pour la fermentation des sucres purs par la levure Saccharomyces cerevisiae no 1116:

- aération: 0,33 à 0,67 vvm tout dépendant du sucre à fermenter;
- agitation: 200 rpm;
- température: 28° C;
- pH: 4,7 $\pm$ 0,2.

CRIQ

Les résultats de ces expériences sont présentés dans les Figures 23 et 24. Les observations suivantes furent faites:

a) dans nos conditions, Saccharomyces cerevisiae no 1116 ne pouvait pas métaboliser le xylose. La croissance de cette levure dans un bouillon xylose à 4% (p/v) était faible (densité optique à 600 nm d'environ 0,6), environ 7 à 8 fois plus faible que celle obtenue dans un bouillon glucose à 4% (p/v), et était probablement due à l'utilisation de substances présentes dans le milieu de base constitué surtout de "Yeast Nitrogen Base". La fermentation du xylose (4%, p/v) fut aussi essayée en fermenteur avec contrôle du pH à 4,7 $\pm$ 0,2 et un taux d'aération de 0,67 vvm; les résultats démontrèrent une fois de plus que S. cerevisiae no 1116 ne pouvait pas métaboliser le xylose (résultats non présentés). Cette conclusion est encore une fois renforçée par les résultats présentés à la Figure 24 et montrant que S. cerevisiae n'utilisa que le glucose du mélange glucose 2%-xylose 2% (p/v);

b) les résultats de la fermentation du glucose par S. cerevisiae sont présentés à la Figure 23. Le glucose fut métabolisé très rapidement, en dedans de 16 heures. Durant les premières 16 heures de la fermentation, une aération de 0,33 vvm fut employée afin de favoriser la croissance de la levure, après quoi l'ajout d'air fut stoppé (tel qu'indiqué par la flèche à la Figure 23), la seule

CRIQ

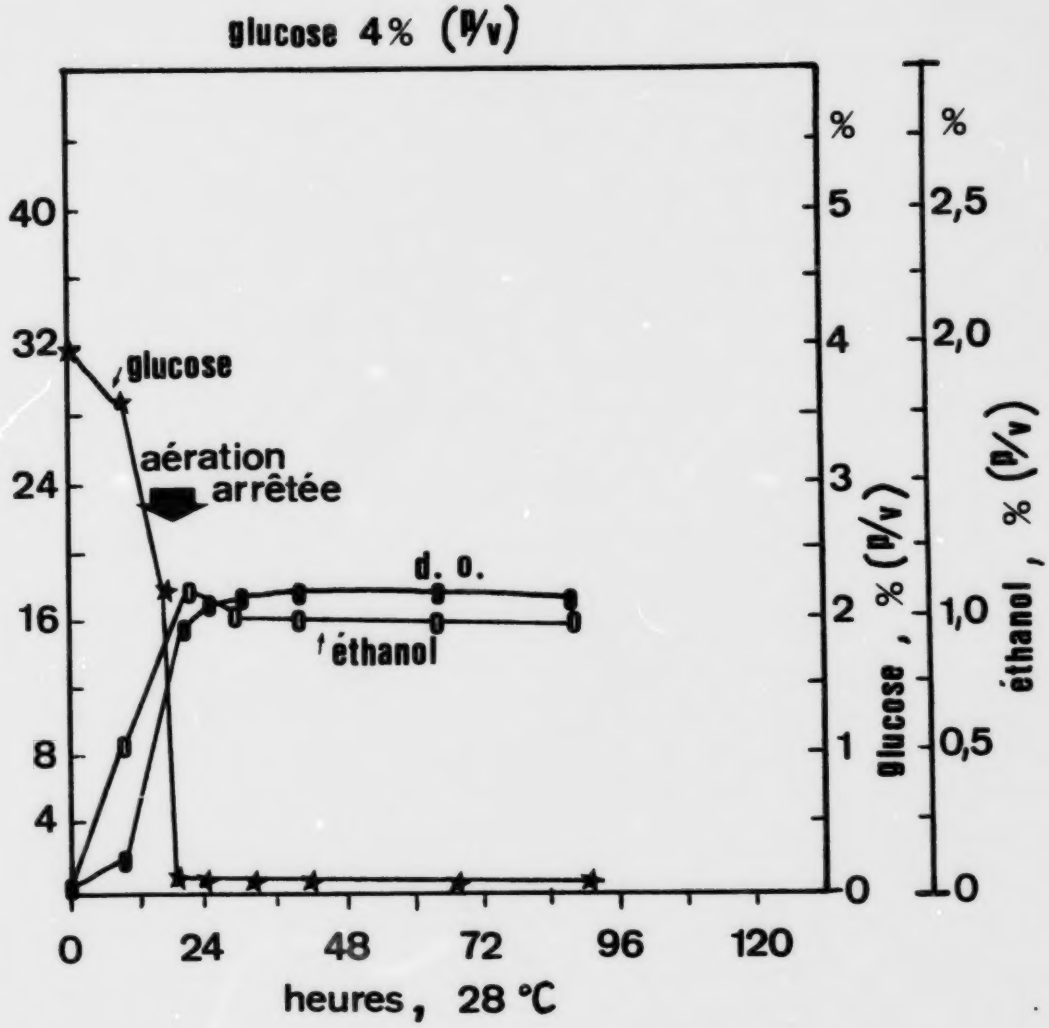


Figure 23: Fermentation d'un bouillon glucose 4% (p/v) par Saccharomyces cerevisiae no 1116. Un inoculum de 10% (v/v) ayant une densité optique de 4,27 fut employé.

Conditions d'opération:		
	aération:	0,33 vvm*
	agitation:	200 rpm
	T°:	28° C
	pH:	4,7 ± 0,2

* Note importante: Pour cette fermentation, l'aération (ajout d'air) fut arrêtée à 16 heures (indiqué par une flèche sur cette figure) afin d'empêcher une trop grande oxydation de l'éthanol produit.

CRIQ

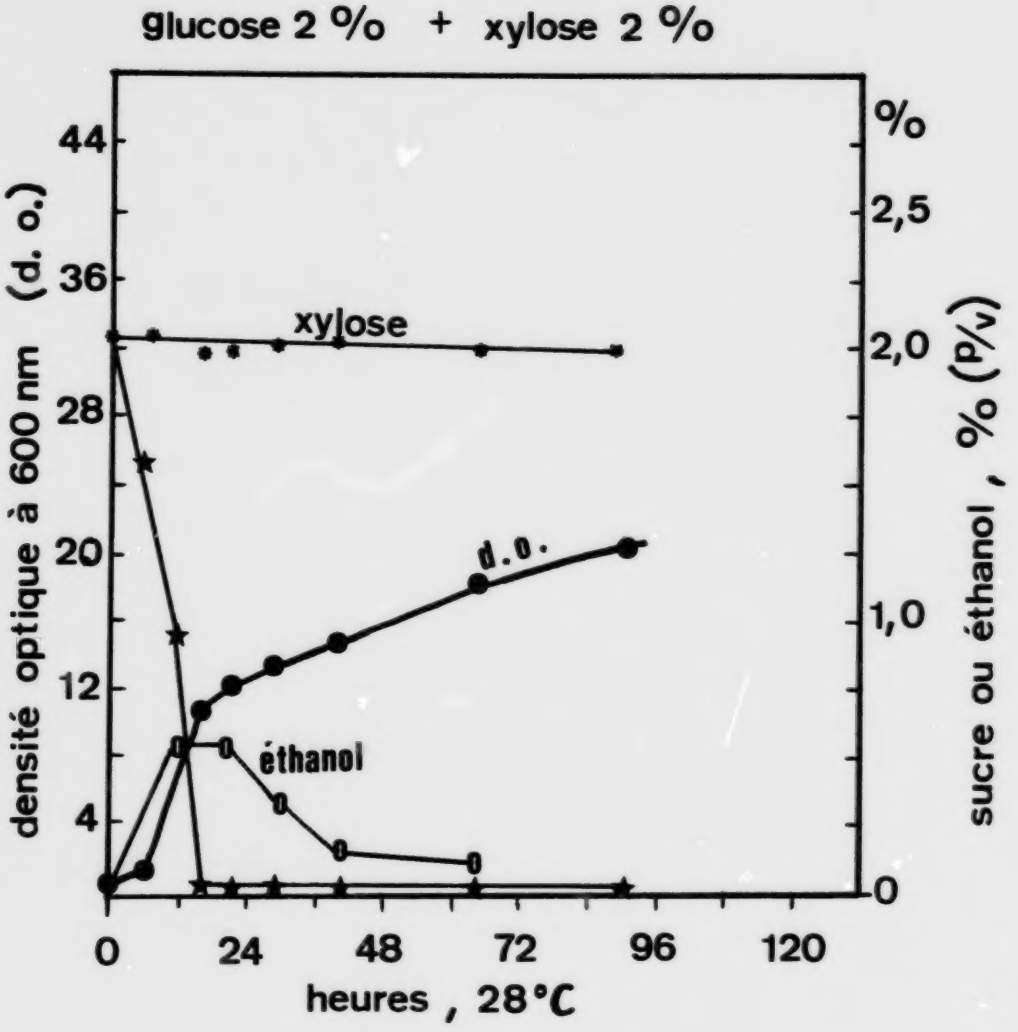


Figure 24: Fermentation d'un bouillon glucose 2% (p/v) + xylose 2% (p/v) par Saccharomyces cerevisia no 1116. Un inoculum de 10% (v/v) ayant une densité optique de 3,37 fut employé.

Conditions d'opération:

aération:	0,5 vvm
agitation:	200 rpm
T°:	28° C
pH:	4,7 ± 0,2

Note: En comparaison avec la fermentation du glucose (Figure 23), ici l'aération fut augmentée à 0,5 vvm et fut conservée durant toute la durée de la fermentation, ceci afin de favoriser peut-être l'utilisation du xylose.

CRIQ

aération résiduelle provenant de l'agitation (200 rpm). Les résultats obtenus montrent bien que l'aération initiale (0,33 vvm) était trop importante et eut un effet très négatif sur l'accumulation de l'éthanol. En effet, les quantités d'éthanol mesurées ne furent qu'environ 60% de celles généralement attendues; le même phénomène fut aussi observé avec la fermentation du glucose (2%, p/v) (Figure 24). De plus, lorsque l'ajout d'air était poursuivi, comme dans le cas de la fermentation du mélange glucose-xylose, 2% (p/v) chacun, l'éthanol produit était en grande partie consommé par les cellules suite à la disparition du glucose (voir Figure 24);

c) il fut conclu que les fermentations subséquentes du glucose par S. cerevisiae no 1116 devront être effectuées dans des conditions moins aérobies que celles employées ici.

3.8.1.3 Résultats avec Zymomonas mobilis

Les fermentations employant la bactérie Zymomonas mobilis ATCC 10988 furent faites dans les conditions suivantes:

- température: 30 ± 1° C;
- pH: 5,0 ± 0,2;
- agitation: très douce, environ 60-75 rpm;
- aération: nulle (sauf pour celle fournie par l'agitation).

CRIQ

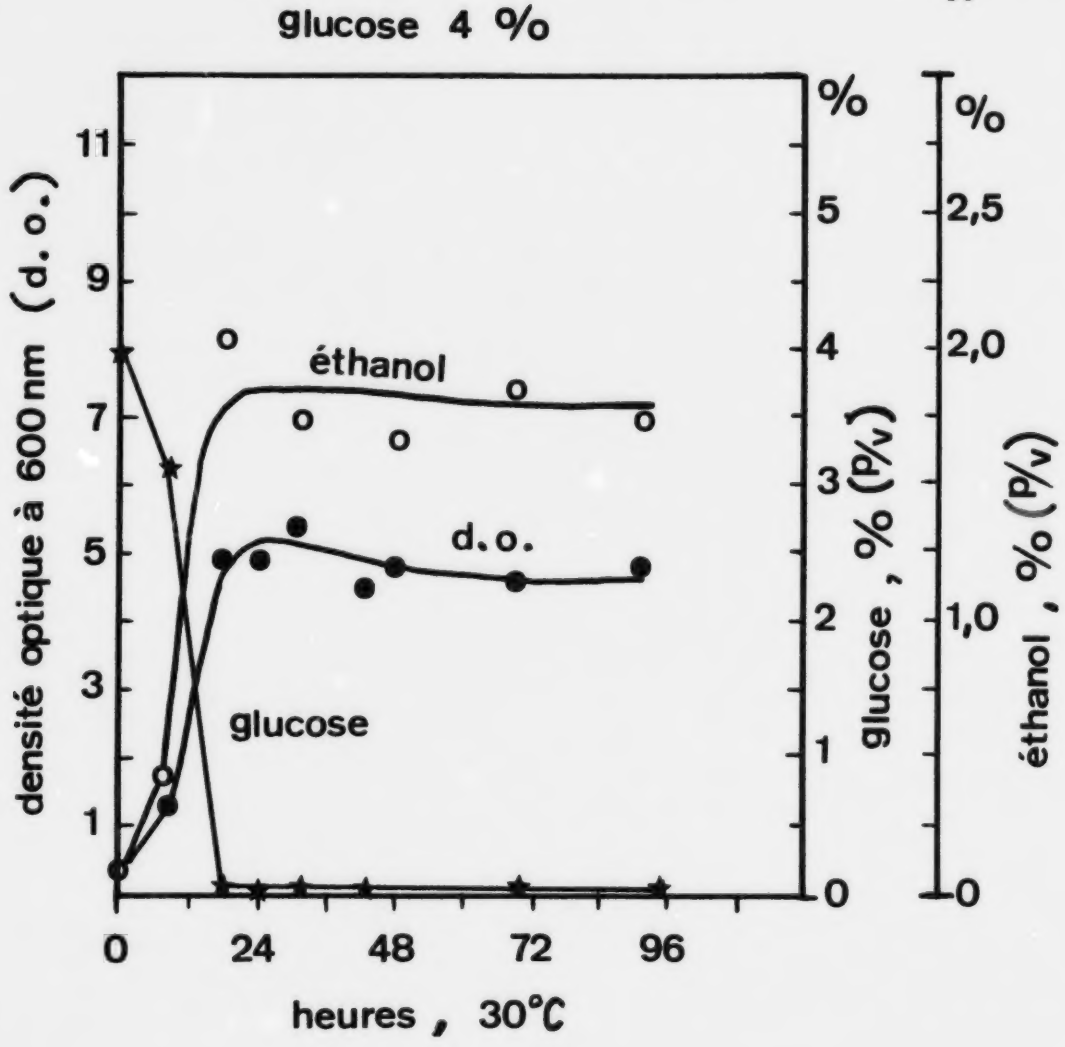


Figure 25: Fermentation d'un bouillon glucose 4% (p/v) par Zymomonas mobilis ATCC 10988. Un inoculum de 10% (v/v) ayant une densité optique de 3,38 fut employé.

Conditions d'opération:

aération:	nil (sauf celle fournie par l'agitation)
agitation:	très douce (environ 60 à 75 rpm)
T°:	30° C
pH:	5 ± 0,2

CRIQ

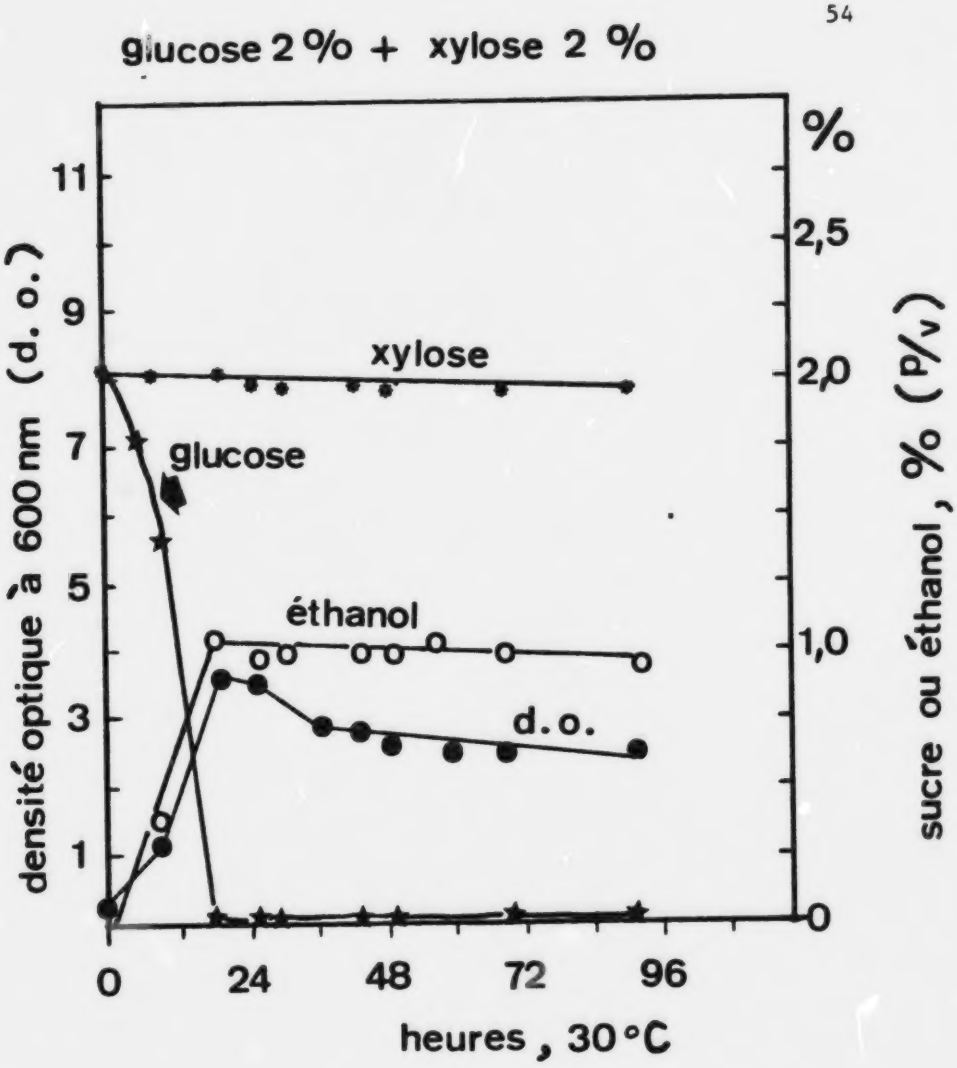


Figure 26: Fermentation d'un bouillon glucose 2% (p/v) + xylose 2% (p/v) par Zymomonas mobilis ATCC 10988. Un inoculum de 10% (v/v) ayant une densité optique de 3,38 fut employé.

Conditions d'opération: identiques à celles décrites dans la légende accompagnant la Figure 25.

CRIQ

Difficultés rencontrées dans la croissance de Z. mobilis: Pendant plusieurs semaines, nous avons éprouvé beaucoup de difficultés à obtenir des inoculums de Z. mobilis qui soient abondants et actifs. Souvent, l'abondance de croissance disparaissait lors du transfert subséquent. Nous avons alors modifié le milieu ou les conditions de culture, ou encore employé de nouvelles cultures de Z. mobilis, sans toutefois résoudre notre problème. Nous avons finalement communiqué avec monsieur Roger Latta (CNRC, Ottawa), lequel nous fit parvenir une nouvelle culture Z. mobilis ATCC 10988 (NRCC 2928), suggéra un nouveau milieu de culture, et suggéra en plus d'initier la croissance de cette bactérie dans des conditions anaérobies, employant une jarre anaérobie de type "Gas Pak". Ces changements furent très bénéfiques pour la croissance de Z. mobilis. L'emploi de la jarre anaérobie est nécessaire seulement lors du premier transfert à partir de la culture lyophilisée; par la suite, la croissance de Z. mobilis s'effectue normalement en prenant soin toutefois de ne pas trop agiter les fioles et d'utiliser des ratios surface/volume faibles.

Les résultats obtenus avec Z. mobilis ATCC 10988 sont les suivants:

a) Z. mobilis ne métabolise pas le xylose (bouillon xylose 4% (p/v), du moins dans les conditions utilisées (résultats non présentés). L'incapacité de cette bactérie à métaboliser le xylose est bien connue;

CRIQ

b) la fermentation du bouillon glucose 4% (p/v) fut très rapide (moins de 24 heures) et très productive en termes d'éthanol produit (Figure 25). Une concentration finale en éthanol de 18-19 g/L fut obtenue à partir d'une concentration en glucose de 40 g/L. Les conditions employées pour cette fermentation semblent donc très appropriées;

c) les résultats obtenus quant à la fermentation du bouillon glucose 2%-xylose 2% (p/v) (Figure 26) montrent une fois de plus que Z. mobilis ne peut fermenter le xylose et que la fermentation du glucose est aussi très rapide et productive en éthanol. Ici, une concentration en éthanol de 9,5 g/L fut obtenue à partir d'une concentration en glucose de 20-21 g/L. La courbe d'utilisation du xylose à la Figure 26 pourrait indiquer une consommation très lente du xylose par Z. mobilis.

3.8.1.4 Résultats cumulatifs

Les principaux résultats obtenus lors de nos tests de fermentation de sucres purs et décrits dans la section 3.8.1 sont compilés au Tableau VIII. En résumé:

a) des trois microorganismes employés, seul P. tannophilus a pu utiliser le xylose;

CRIQ

b) avec P. tannophilus, la fermentation du glucose fut beaucoup plus rapide que celle du xylose, bien que les rendements en éthanol soient équivalents;

c) S. cerevisiae et Z. mobilis utilisèrent le glucose plus rapidememt que P. tannophilus;

d) le rendement en éthanol après fermentation du glucose par S. cerevisiae fut inférieur (0,3 g/g) à celui généralement attendu (0,45-0,48), probablement dû au fait que les conditions de fermentation étaient trop aérobies.

3.9 Fermentation des hydrolysats obtenus après hydrolyse enzymatique des oligosaccharides extraits des divers bois prétraités

Les oligosaccharides (probablement des dérivés des hémicelluloses) présents dans les concentrés de sucres solubles (filtrats) obtenus de chacun des bois prétraités furent d'abord hydrolysés enzymatiquement pour donner des hydrolysats contenant surtout du xylose. Ces travaux furent décrits dans la section 3.7 de ce rapport. On testa ensuite la fermentescibilité de ces hydrolysats en les soumettant à l'action de la levure Pachysolen tannophilus, le seul des trois microorganismes précédemment évalués capable de fermenter le xylose en éthanol (voir Tableau VIII). Les quatre hydrolysats furent traités comme suit:

a) les tests de fermentation furent faits par groupe de deux hydrolysats;

TABLEAU VIII

FERMENTATION DE SUCRES PURS; RÉSULTATS OBTENUS AVEC P. TANNOPHILUS, S. CEREVISIAE ET Z. MOBILIS*

PARAMÈTRE	P. TANNOPHILUS	S. CEREVISIAE	Z. MOBILIS
Fermentation de:			
• glucose 4%	+	+	+
• xylose 4%	+	-	-
Durée de la fermentation:			
• glucose 4%	36 h	16-17 h	18-19 h
• xylose 4%	72 h	----	----
Rendement en éthanol (éthanol/sucre consommé, en g/g)			
• glucose 4%	0,45-0,47	0,30	0,42-0,47
• xylose 4%	0,43-0,45	----	----

*: Figures 20, 21, 23, 25 et section 3.8.1 de ce rapport.

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

b) à chacun des hydrolysats testés, du glucose (4%) ou du xylose (4%) fut aussi ajouté afin de vérifier la présence ou non d'inhibiteurs;

c) la fermentation du xylose (4%) en éthanol fut aussi effectuée en parallèle et servait de fermentation - contrôle.

3.9.1 Fermentation des hydrolysats obtenus des filtrats nos 1 et 2

Les fermentations furent faites telles que décrites dans l'Annexe "C" de ce document, section C.7. A chacun des hydrolysats devant être fermenté, on ajouta une certaine quantité de sels minéraux et de suppléments azotés ("YNB") afin d'en faire un milieu propice à la croissance de la levure Pachysolen tannophilus. Le pH (23° C) de chacun des milieux fut ajusté à 6,4 - 6,5 avec des granules de NaOH. Notons ici que ces milieux ne furent pas stérilisés mais furent inoculés aussitôt que possible.

Les résultats de cette première expérience sont présentés dans le Tableau IX. Les observations suivantes furent faites:

a) Dans les conditions employées, la production d'éthanol par P. tannophilus à partir des deux hydrolysats testés (nos 1 et 2) fut à peu près nulle. Cette production ne fut guère améliorée par l'ajout de xylose pur (concentration finale: 4%) aux deux hydrolysats. Des analyses subséquentes démontrèrent que le xylose avait été très peu consommé durant cette fermentation, expliquant par le fait même la quasi-absence de production d'éthanol;

CRIQ

b) La production d'éthanol fut toutefois abondante lorsque du glucose (concentration finale: 4%) fut ajouté aux deux hydrolysats; de plus, tout le glucose disponible avait été consommé après 120 h de fermentation;

c) L'absence de production d'éthanol à partir du xylose, telle que décrite en (a), n'était pas due à l'incapacité de la levure P. tannophilus de fermenter le xylose puisque la fermentation - contrôle (milieu xylose 4%) fut réussie.

A ce stade des travaux de fermentation, il était difficile d'expliquer ces résultats quelque peu surprenants. Il fut toutefois décidé de répéter cette expérience. Cette fois-ci, l'agitation fut augmentée à 150 rpm afin de favoriser l'aération des cultures, le métabolisme du xylose par P. tannophilus demandant un certain degré d'oxygénation (Maleszka et Schneider, 1982). Les résultats de cette deuxième expérience sont soumis dans le Tableau X.

On en tira les conclusions suivantes:

a) En général, la consommation du xylose présent dans les hydrolysats fut grandement améliorée grâce à l'augmentation de l'agitation, donc de l'aération. Par ricochet, la production d'éthanol à partir du xylose fut aussi améliorée, bien qu'elle fusse encore très faible;

b) Comme lors de la première expérience, la fermentation de xylose pur (xylose 4%) par P. tannophilus fut réussie, tout le xylose disponible étant fermenté pour donner une concentration en éthanol de 0,84% (P/V) après 140 h (fermentation - contrôle);

CRIQ

TABLEAU IX

PRODUCTION D'ÉTHANOL PAR P. TANNOPHILUS[1] A PARTIR DES SUCRES PRÉSENTS DANS LES HYDROLYSATS OBTENUS DES FILTRATS NOS 1 ET 2. PREMIÈRE EXPÉRIENCE (agitation=125 rpm)

MILIEU	ÉTHANOL (%, P/V)[3] APRÈS 0 h	48 h	72 h	98 h	120 h	CONSOMMATION[4] APRÈS 120 h du: XYLOSE	GLUCOSE
- Hydrolysat No 1 (xylose= 1,63%)							
- seul	0,02	0	0,02	0,02	0	0%	-
-+ glucose 4%	0	0,28	1,59	1,56	1,75	12%	100%
-+ xylose 4%	0	0,02	0,05	0,08	0,09	0%	-
- Hydrolysat no 2 (xylose= 1,9%)							
- seul[2]	0	0,01	0	0	0,06	0%	-
-+ glucose 4%	0	0,18	1,67	1,59	1,71	10%	100%
-+ xylose 4%	0	0,03	0,03	0,09	0,03	9%	-
- Fermentation - contrôle							
- xylose 4%	0	0,25	0,59	0,92	0,95	100%	-

(1) P. tannophilus ATCC 10988.
(2) Les deux hydrolysats contenaient surtout (sinon seulement) du xylose comme sucre soluble.
(3) Mesuré par chromatographie en phase gazeuse.
CONDITIONS DE FERMENTATION: - 125 rpm, 30°C (incubateur Psychrotherm de New Brunswick Sci.)
- 50 mL de milieu/fiole Erlenmeyer de 125 mL
- inoculum: 3 mL/fiole
(4) Déterminée par chromatographie liquide sous haute pression ("HPLC").

CRIQ

TABLEAU X

PRODUCTION D'ÉTHANOL[1] PAR P. TANNOPHILUS A PARTIR DES SUCRES PRÉSENTS DANS LES HYDROLYSATS OBTENUS DES FILTRATS NOS 1 ET 2. DEUXIÈME EXPÉRIENCE (agitation= 150 rpm)

MILIEU	ÉTHANOL (%, P/V)[3] APRÈS 0 h	48 h	72 h	96 h	118 h	140 h	CONSOMMATION APRÈS 140 h du: XYLOSE	GLUCOSE
- Hydrolysat no 1 (xylose= 1,63%)								
- seul	0,02	0	0,02	0,03	0,07	0,11	65%	-
-+ glucose 4%	0,02	0,45	1,62	1,55	1,68	1,8	47%	100%
-+ xylose 4%	0,02	0,02	0,08	0,13	0,21	0,36	42%	-
- Hydrolysat no 2 (xylose= 1,88%)								
- seul [2]	0,02	0,02	0,03	0,05	0,10	0,04	17%	-
-+ glucose 4%	0,02	-	1,50	1,57	1,64	1,77	36%	100%
-+ xylose 4%	0,02	-	0,09	0,13	0,20	0,26	16%	-
- Fermentation - contrôle								
- xylose 4%	0,02	0	0,18	0,34	0,85	0,84 (2)	100%	-

(1) Expérience faite exactement telle que décrite au bas du Tableau IX sauf que l'agitation fut augmentée à 150 rpm afin de favoriser l'aération des cultures et par le fait même favoriser peut-être la consommation du xylose.

(2) Cette fermentation produisit aussi des quantités appréciables de xylitol (0,6%, P/V).

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

c) Une fois de plus, tout le glucose ajouté aux deux hydrolysats fut consommé pour donner des concentrations finales en éthanol de l'ordre de 1,7 - 1,8% (P/V).

Suite à ces deux expériences, nous fûmes forcés de conclure que la fermentation en éthanol, avec la levure P. tannophilus, du xylose présent dans les deux hydroloysats (nos 1 et 2), ou encore ajouté à ces deux hydrolysats, était véritablement problématique. Il n'y avait pourtant aucun problème dans la fermentation du glucose. Les difficultés de la levure P. tannophilus à métaboliser le xylose en éthanol dans ces deux hydrolysats pourraient être dues à la présence d'un ou de plusieurs inhibiteurs dans ces hydrolysats affectant spécifiquement le métabolisme du xylose, mais non pas celui du glucose, ou encore à des conditions spéciales d'oxydo-réduction non encore maîtrisées. D'autres raisons pourraient aussi être possibles.

Notons finalement qu'une quantité appréciable (0,6%, P/V) de xylitol fut trouvée dans la liqueur de la fermentation - contrôle (xylose 4%) après 140 h de fermentation. Le xylitol ne fut toutefois pas détecté dans les divers hydrolysats fermentés.

La consommation de xylose et/ou de glucose durant les diverses fermentations fut calculée à partir des données obtenues par chromatographie en phase liquide sous haute pression ("HPLC"). Il ne servirait à rien de présenter dans ce rapport tous les chromatogrammes recueillis. Nous désirons toutefois soumettre ici les

CRIQ

chromatogrammes (voir Figure 27) obtenus pour la fermentation du mélange Hydrolysat no 1 + glucose 4%: on peut y remarquer l'excellente séparation du glucose et du xylose et la production évidente d'éthanol à partir de ce mélange de sucres.

3.9.2 Fermentation des hydrolysats obtenus des filtrats nos 3 et 4

Les tests de fermentescibilité des deux derniers hydrolysats de cette série, les hydrolysats nos 3 et 4, employant aussi la levure P. tannophilus ATCC 10988, furent faits exactement tels que décrits au bas du Tableau X (30°C, 150 rpm). Les résultats de ces tests sont présentés dans le Tableau XI. On peut en tirer les conclusions suivantes:

a) la production d'éthanol à partir des deux hydrolysats testés, nos 3 et 4, fut très faible, comme dans les tests précédents (Tableaux IX et X). Le xylose présent dans ces deux hydrolysats fut toutefois largement utilisé par P. tannophilus, de telle sorte qu'ici la faible production d'éthanol n'était pas due à un manque de consommation du xylose;

b) une certaine production d'éthanol fut obtenue après fermentation des mélanges hydrolysat + xylose 4%. Cette production est particulièrement appréciable dans le cas du mélange Hydrolysat no 4 + xylose 4%, où la quantité d'éthanol mesurée à 144 h (0,87% éthanol) est identique à celle obtenue (0,85% éthanol) dans la fermentation - contrôle (xylose 4%) à 120 h;

CRIQ

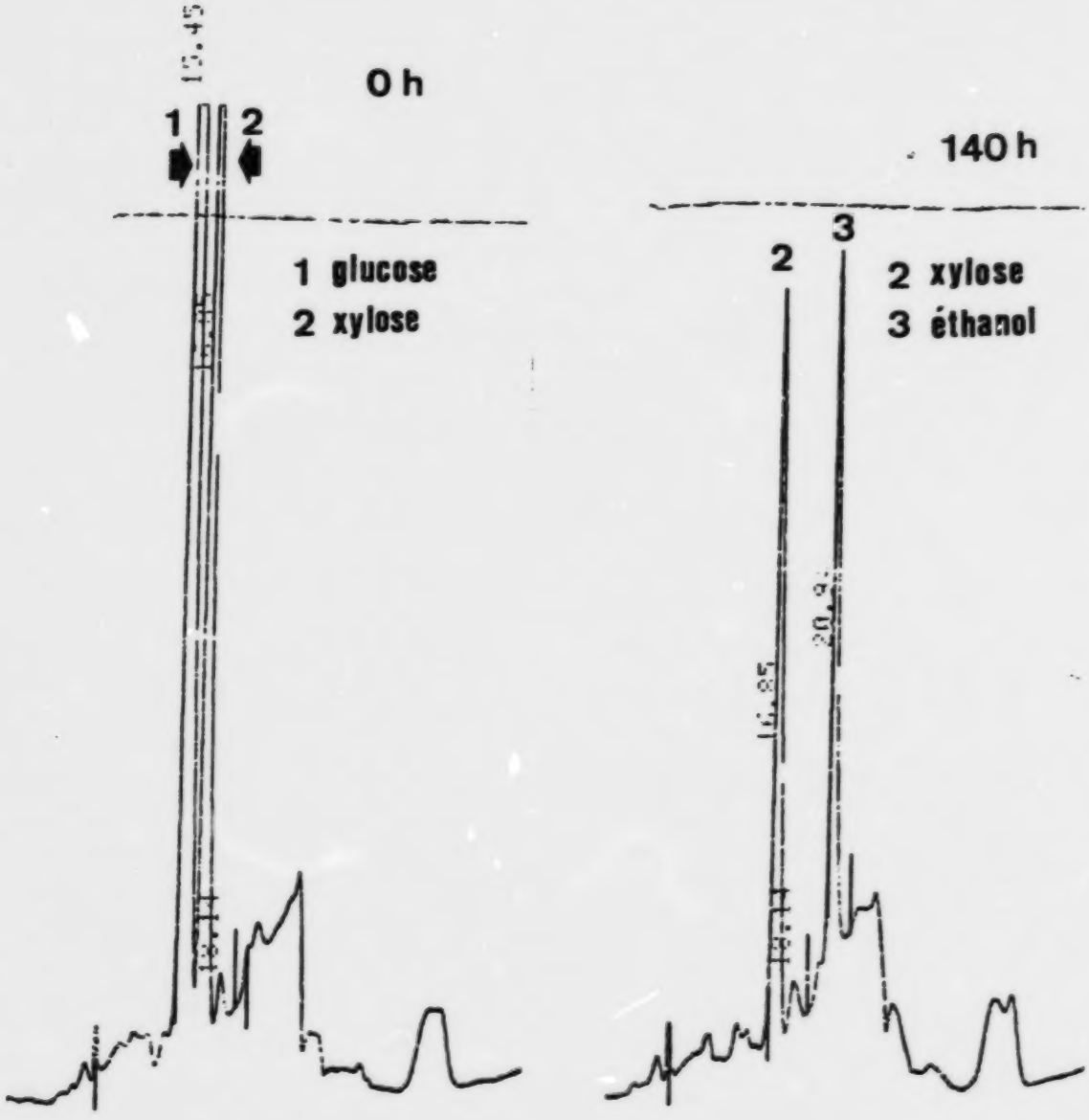


Figure 27: Analyse, par chromatographie liquide sous haute pression, du mélange Hydrolysat no 1 + glucose 4% (voir Tableau X) après 0 et 140 h de fermentation avec la levure P. tannophilus ATCC 10988. Noter l'excellente séparation obtenue entre le glucose et le xylose.

CRIQ

TABLEAU XI

PRODUCTION D'ÉTHANOL PAR P. TANNOPHILUS (1) A PARTIR DES SUCRES PRÉSENTS DANS LES HYDROLYSATS OBTENUS DES FILTRATS NOS 3 ET 4 (agitation= 150 rpm)

MILIEU	ÉTHANOL (%, P/V) (3) APRÈS						CONSOMMATION (4) APRÈS 144 h DU:	
	0 h	48 h	72 h	97 h	120 h	144 h	XYLOSE	GLUCOSE
- Hydrolysat no 3 (xylose= 2,12%)								
- seul	0,03	0,03	0,06	0,11	0,14	0,18	79%	-
-+ glucose 4%	0,03	1,35	1,59	1,48	1,63	1,46	68%	100%
-+ xylose 4%	0,03	0,09	0,14	0,22	0,29	0,35	40%	-
- Hydrolysat no 4 (xylose= 1,2%)								
- seul (2)	0,03	0	0,02	0,07	0,05	0,02	100%	-
-+ glucose 4%	0,03	1,74	1,62	1,61	1,67	1,47	93%	100%
-+ xylose 4%	0,03	0,07	0,15	0,40	0,57	0,87	70%	-
- Fermentation - contrôle								
- xylose 4%	0,03	0,01	0,22	0,62	0,85	0,65	100%	-

(1) P. tannophilus ATCC 10988.

(2) Les deux hydrolysats contenaient surtout (sinon seulement) du xylose comme sucre soluble.

(3) Mesuré par chromatographie en phase gazeuse.
CONDITIONS DE FERMENTATION: 150 rpm, 30°C (voir bas de Tableau X).

(4) Déterminée par chromatographie liquide sous haute pression ("HPLC").

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

c) encore une fois, la levure P. tannophilus fermenta facilement le glucose ajouté à chacun des hydrolysats pour donner des quantités appréciables d'éthanol (environ 1,6% (P/V)).

3.10 Fermentation des hydrolysats dérivés des résidus prétraités

Tel que décrit plus tôt (voir section 3.6), les quatre résidus obtenus après la double extraction de la lignine et séchage à l'air libre furent soumis à une double hydrolyse enzymatique (sections 3.6.2 et 3.6.3) afin d'hydrolyser la cellulose des résidus en glucose. Les hydrolysats ainsi obtenus, après centrifugation afin d'enlever les matières insolubles, furent ensuite concentrés sous vide partiel à 70-75° C puis placés au congélateur en vue de tests de fermentescibilité à venir. Nous présentons ici les résultats de ces tests. Pour ces travaux, il fut décidé d'employer uniquement la levure Saccharomyces cerevisiae, le microorganisme le plus connu des trois microorganismes préalablement évalués. Les quantités plutôt limitées d'hydrolysats en notre possession nous forcèrent à faire ce choix.

3.10.1 Résultats préliminaires

Des tests préliminaires furent d'abord faits avec chacun des hydrolysats. Les bouillons de fermentation furent préparés comme suit:

CRIQ

. à 800 mL d'hydrolysat, on ajouta d'abord 100 mL de solution minérale 10X. Après mélange, des volumes de 135 mL furent dispensés dans des fioles Erlenmeyer de 250 mL (bouchon-éponge). Il était prévu que du "YNB" stérile devait être ajouté après stérilisation du bouillon de base;

. les bouillons furent ensuite stérilisés à l'autoclave (121° C - 10 min.).

La stérilisation de ces divers bouillons fut une malheureuse décision: elle conduisit en effet à la formation de gros "précipités", jaunâtres dans chacune des fioles (figure 28). Des tests préliminaires indiquèrent qu'il pourrait s'agir de protéines coagulées. Il fut donc décidé de ne pas stériliser les bouillons.

3.10.2 Fermentation des hydrolysats dérivés des résidus prétraités

La fermentation des hydrolysats, tel qu'expliqué plus tôt, sera faite sans stérilisation des bouillons afin de prévenir la formation d'un "précipité" et emploiera la levure S. cerevisiae. Les bouillons de fermentation furent préparés comme suit:

. à 500 mL d'hydrolysat, on ajouta 55 mL de la solution minérale 10X et 3,72 g de "YNB";

. après mélange, le pH fut ajusté à 6,4-6,5 par l'ajout de pastilles de NaOH;

CRIQ CENTRE DE RECHERCHE INDUSTRIELLE DU QUÉBEC

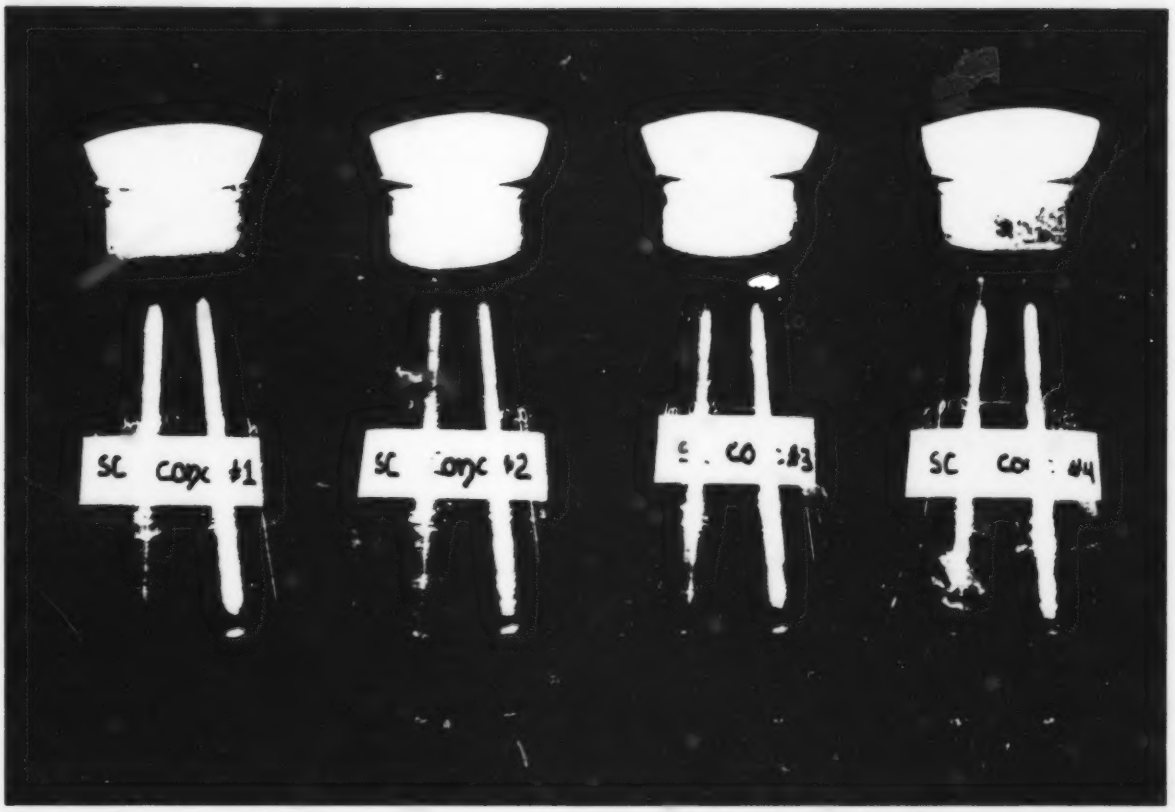


Fig. 28: Fermentation des hydrolysats dérivés des résidus prétraités. Apparence des bouillons de fermentation suite à leur stérilisation à l'autoclave.

CRIQ

. des volumes de 50 mL furent alors dispensés dans des fioles Erlenmeyer de 125 mL (bouchon-éponge). A cinq de ces fioles, on ajouta 2 g de glucose afin de tester la présence ou non d'inhibiteur(s) dans les hydrolysats;

. les fermentations furent initiées par l'ajout de 3 mL d'inoculum à chaque fiole. L'inoculum fut préparé dans un bouillon de 2% glucose préalablement stérilisé à l'autoclave (voir annexe C.1.2 pour la préparation du bouillon).

Les résultats obtenus avec les hydrolysats des résidus nos 1 et 2 sont présentés au Tableau XII. On peut en tirer les conclusions suivantes:

. le glucose présent dans l'hydrolysat no 1, ou encore ajouté à l'hydrolysat, ne fut que très partiellement fermenté. On peut donc en conclure que l'hydrolysat no 1 contenait un ou plusieurs inhibiteur(s) de la fermentation. Cette observation rejoignait d'autres semblables faites dans le cours d'expériences préliminaires antérieures (résultats non présentés);

. quant au glucose présent dans l'hydrolysat no 2 ou ajouté à cet hydrolysat, il fut complètement fermenté pour donner des rendements raisonnables en éthanol.

CRIQ

TABLEAU XII

PRODUCTION D'ÉTHANOL PAR S. CEREVISIAE (1) À PARTIR DES HYDROLYSATS ENZYMATIQUES NOS 1 ET 2 DÉRIVÉS DES RÉSIDUS PRÉTRAITÉS

MILIEU	ÉTHANOL (%, p/v) (3) APRÈS						CONSOMMATION (4) DU GLUCOSE APRÈS 120 h
	0 h	24 h	48 h	72 h	98 h	120 h	
Hydrolysat no 1 (glucose= 1,94%)							
. seul (2)	0,025	0,045	0,038	0,062	0,159	0,298	29%
. +4% glucose	0,028	0,032	0,043	0,077	0,160	0,282	6%
Hydrolysat no 2 (glucose= 1,92%)							
. seul (2)	0,031	0,039	0,190	0,559	0,467	0,662	100%
. +4% glucose	0,037	0,049	0,194	0,592	1,696	1,988	100%
Fermentation-contrôle							
. glucose 2%	0,020	0,381	0,679	0,649	0,703	——	100%

(1) S. cerevisiae no 1116 (Lallemand Inc., Montréal).

(2) Les deux hydrolysats contenaient surtout du glucose comme sucre soluble dérivé des résidus après hydrolyse enzymatique.

(3) Mesuré par chromatographie en phase gazeuse.

(4) Déterminée par chromatographie liquide sous haute pression ("HPLC").

CONDITIONS DE FERMENTATION: 125 rpm, 28° C (incubateur Psychrotherm de New Brunswick Sci.)
50 mL de milieu/fiole Erlenmeyer de 125 mL
inoculum: 3 mL/fiole

CRIQ

Les résultats obtenus avec les deux derniers hydrolysats, nos 3 et 4, sont compilés au Tableau XIII. Les observations suivantes furent faites:

- le glucose présent dans les deux hydrolysats fut complètement fermenté pour donner des rendements raisonnables en éthanol;

- le glucose présent dans les hydrolysats supplémentés en glucose ne fut que partiellement fermenté. On peut penser que ces hydrolysats contenaient un ou plusieurs facteur(s) inhibant partiellement la fermentation du glucose en éthanol.

Deux conclusions majeures peuvent être tirées des résultats obtenus lors de nos travaux de fermentation des hydrolysats des résidus prétraités:

- un seul (hydrolysat no 1) des quatre hydrolysats évalués se montra récalcitrant à la conversion du glucose présent en éthanol par fermentation. Cet hydrolysat contenait probablement un ou plusieurs inhibiteur(s) de cette fermentation;

- le glucose présent dans les trois autres hydrolysats fut assez facilement fermenté, pour donner des rendements raisonnables en éthanol. Cependant, la vitesse de formation d'éthanol observée dans ces fermentations était plus lente que celle des fermentations contrôles, suggèrant que les trois hydrolysats pouvaient contenir aussi certains inhibiteurs de la fermentation.

CRIQ

TABLEAU XIII

PRODUCTION D'ÉTHANOL PAR S. CEREVISIAE [1] À PARTIR DES HYDROLYSATS ENZYMATIQUES NOS 3 ET 4 DÉRIVÉS DES RÉSIDUS PRÉTRAITÉS

MILIEU	ÉTHANOL (%, p/v) [3] APRÈS						CONSOMMATION [4] DU GLUCOSE APRÈS
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	120 h
Hydrolysat no 3 (glucose= 1,90%)							
. seul (2)	0,045	0,104	0,318	0,440	0,493	0,615	100%
. +4% glucose	0,046	0,084	0,301	0,381	0,588	0,719	48,4%
Hydrolysat no 4 (glucose= 1,24%)							
. seul (2)	0,039	0,107	0,452	0,511	0,504	0,467	100%
. +4% glucose	0,044	0,115	0,449	0,548	0,900	1,075	75,5%
Fermentation-contrôle							
. glucose 2%	0,067	0,711	0,481	0,384	0,513	0,446	100%

(1) S. cerevisiae no 1116 (Lallemand Inc., Montréal).

(2) Les deux hydrolysats contenaient surtout du glucose comme sucre soluble dérivé des résidus après hydrolyse enzymatique.

(3) Mesuré par chromatographie en phase gazeuse.

(4) Déterminée par chromatographie liquide sous haute pression ("HPLC").

CONDITIONS DE FERMENTATION: 125 rpm, 28° C (incubateur Psychrotherm de New Brusnwick Sci.
50 mL de milieu/fiole Erlenmeyer de 125 mL
inoculum: 3 mL/fiole

CRIQ

4.0 DISCUSSIONS ET RECOMMANDATIONS

Le but premier de cette partie du projet était d'évaluer la fermentescibilité d'hydrolysats enzymatiques dérivés des hémicelluloses et de la cellulose de divers bois prétraités dans l'unité de prétraitement thermo-mécano-chimique en phase aqueuse de l'Université de Sherbrooke. Le degré de conversion des divers sucres en éthanol par fermentation avec des levures fut pris comme critère de fermentescibilité. L'essentiel de nos discussions tournera donc autour de ce point. Cette évaluation de la fermentescibilité devait permettre, par ricochet, d'évaluer aussi la qualité des bois prétraités sortant de l'unité de prétraitement de l'Université de Sherbrooke.

La préparation des divers hydrolysats enzymatiques requis pour les tests de fermentescibilité exigea des efforts assez considérables. Les quatre bois prétraités reçus de l'Université de Sherbrooke durent être soumis à toute une série de traitements (extractions, concentrations, hydrolyses enzymatiques, tests préliminaires, etc.) avant de pouvoir effectuer les tests de fermentescibilité. Chacun des traitements importants sera ici brièvement discuté avant d'entamer plus loin la discussion sur les résultats de nos travaux de fermentation.

CRIQ

4.1 Extraction des sucres solubles présents dans les résidus prétraités

Suivant réception des échantillons de bois prétraités, ceux-ci furent d'abord soumis à une centrifugation afin de séparer le filtrat (contenant présumément des sucres solubles) et le résidu (fibres lignocellulosiques prétraitées). Il fut assumé que les sucres présumément présents dans le filtrat résultaient du prétraitement du bois effectué à l'Université de Sherbrooke. Dans un deuxième temps, afin de récupérer les sucres solubles possiblement présents dans les résidus, les résidus furent soumis à une extraction à l'eau chaude dans des extracteurs de type SOXHLET permettant la recirculation de l'extrait. Ces extraits furent ensuite combinés aux filtrats obtenus après centrifugation et les mélanges concentrés sous vide partiel à 80 $\pm$ 5° C (sections 3.1 à 3.3 et Figures 2 à 4). Des analyses subséquentes de chacun des concentrés de sucres solubles ainsi obtenus livrèrent les conclusions suivantes:

- tous les concentrés étaient relativement acides (pH variant de 3,87 à 4,24 à T= 23° C) (Tableau III);

- la concentration en matières dissoutes, mesurée par réfractométrie, de chacun des concentrés était assez faible (°Brix variant de 4,0 à 6,5)(Tableau III);

CRIQ

- tous les concentrés contenaient très peu de sucres solubles simples, tels le glucose ou le xylose (Figures 5 à 8). Il fut plutôt conclu que les sucres solubles présents consistaient surtout d'oligosaccharides dérivés de la cellulose ou des hémicelluloses du bois. La présence d'oligosaccharides, plutôt que de monosaccharides, indiqua que le prétraitement de l'Université de Sherbrooke avait été assez doux.

Recommandation no 1: Étant donné les efforts requis pour l'extraction des sucres solubles résiduels, il faudrait vérifier si l'extraction à l'eau chaude de ces sucres est vraiment nécessaire et justifie les dépenses encourues en temps, main-d'oeuvre et énergie.

4.2 Extraction de la lignine

Il est bien connu que la présence de lignine dans les matières lignocellulosiques empêche l'hydrolyse enzymatique efficace des fibres cellulosiques. Les résidus en notre possession furent donc soumis à une extraction en milieu alcoolisé et acidifié (Figure 9 et Annexe B.1) afin d'extraire cette lignine. Cette extraction fut faite deux fois, pour chacun des résidus, afin de maximiser l'extraction. Les extraits de lignine furent pas la suite concentrés sous vide partiel. Durant cette concentration, une partie de la lignine précipita sur le paroi du ballon pour donner un précipité noirâtre; la concentration des extraits fut donc arrêtée à ce stage. Une photo des quatre concentrés de lignine est présentée à la Figure 10. De plus, on trouvera à la Figure 11 une photo des quatre résidus cellulosiques obtenus après la double extraction de la lignine et séchage à l'air libre.

CRIQ

Recommandation no 2: Analyser les extraits de lignine obtenus, mesurer la concentration en sucres de ces extraits, et initier des travaux visant à trouver des applications pour cette lignine. De plus, chercher à améliorer le procédé d'extraction de la lignine.

4.3 Hydrolyse enzymatique des oligosaccharides présents dans les concentrés de sucres solubles

Plus tôt (voir section 4.1), nous avons mentionné que la grande majorité des sucres solubles présents dans les concentrés de sucres solubles extraits étaient constitués présumément d'oligosaccharides probablement dérivés de la cellulose et des hémicelluloses du bois. Avant de soumettre ces sucres à la fermentation, il fallait donc hydrolyser les oligosaccharides en sucres plus simples. La voie enzymatique fut sélectionnée parce qu'elle est moins énergivore et non-corrosive comparée à l'hydrolyse acide. Comme il est difficile d'obtenir des préparations commerciales d'enzymes hémicellulolytiques, il fut décidé d'utiliser, comme source de ces enzymes, la préparation d'enzymes celiulolytiques Celluclast 1,5 L de NOVO, sur la base que les préparations d'enzymes cellulolytiques peu purifiées contiennent presque toujours des enzymes capables de dégrader les hémicelluloses (ou xylans).

L'hydrolyse enzymatique des oligosaccharides fut très facile et apparemment complète (section 3.7.1; voir aussi Figure 17 comme exemple). Des tests préliminaires démontrèrent que l'hydrolyse des oligosacchrides était quasi-complète après 9 heures 15 minutes d'hydrolyse; par sécurité, toutefois, l'hydrolyse des

CRIQ

oligosaccharides fut maintenue pendant 24 heures afin d'obtenir une hydrolyse aussi complète que possible. Tous les hydrolysats enzymatiques ainsi obtenus ne contenaient à peu près que du xylose comme sucre soluble identifiable. Ceci prouvait deux choses:

- d'abord, que les oligosaccharides présents dans les concentrés de sucres solubles étaient bien dérivés des hémicelluloses du bois (riches en xylose);

- ensuite, que l'absence quasi-totale de glucose dans ces hydrolysats démontrait que le prétraitement subi par tous les échantillons de bois avait été très sélectif; en effet, seule la fraction hémicellulose du bois fut apparemment touchée.

Recommandation no 3: Vu la facilité relative avec laquelle nous avons pu préparer des hydrolysats enzymatiques riches en xylose, il y aurait intérêt à optimiser et exploiter la filière bois sirop de xylose. On pourrait alors rechercher les conditions de prétraitement du bois favorisant le plus possible la solubilisation des hémicelluloses du bois en oligosaccharides, sans toucher à la cellulose, hydrolyser ces oligosaccharides en xylose par méthode enzymatique, et utiliser ces sirops de xylose pour la production d'éthanol, de protéines, de xylitol, ou d'autres produits.

4.4 Hydrolyse enzymatique des résidus (fibres cellulosiques) après la double extraction de la lignine

Il est bien connu que la cellulose est beaucoup plus difficile à hydrolyser enzymatiquement que les hémicelluloses. Nous avons présenté plus tôt dans ce

CRIQ

rapport (section 3.6) les résultats compilés lors de nos travaux d'hydrolyse enzymatique (cellulases + β-glucosidase) des résidus obtenus après le prétraitement subi à l'Université de Sherbrooke et la double extraction de la lignine. Les points suivants doivent être soulignés:

. nous avons choisi d'effectuer l'hydrolyse enzymatique en deux étapes, employant chaque fois la moitié de la quantité habituelle de cellulases (préparation Celluclast). Cette quantité réduite de cellulases n'empêchait pas d'atteindre un degré d'hydrolyse aussi élevé que celui fourni par la quantité habituelle d'enzymes (section 3.6.1, page 30); de plus, l'hydrolyse en deux étapes plutôt qu'une avait le potentiel de produire un plus fort degré d'hydrolyse enzymatique en réduisant les risques d'inhibition par le ou les produit(s) d'hydrolyse;

. le degré d'hydrolyse (% d'hydrolyse cumulatif) obtenu après les deux étapes d'hydrolyse pour chacun des quatre résidus est présenté dans le Tableau VI. Le degré d'hydrolyse varia de 55,8 à 64,4%. La "concentration" des résidus dans les mélanges réactionnels était de 1,8% (p/v). Comme on peut le constater, le degré d'hydrolyse atteint après la première étape d'hydrolyse fut toujours supérieur à celui de la deuxième étape;

. le glucose était le seul sucre soluble facilement identifiable et quantifiable produit durant l'hydrolyse enzymatique des résidus;

. l'hydrolyse enzymatique d'une cellulose hautement purifiée, la cellulose "Solka-Floc", fut plus facile à réaliser que celle des résidus. Le degré d'hydrolyse de la cellulse "Solka-Floc" était presque toujours de 80% et plus. Comme dans le cas des résidus, le glucose était le seul produit d'hydrolyse facilement identifiable.

Recommandation no 4: Nous avons effectué l'hydrolyse enzymatique des résidus suite à la double extraction de la lignine et séchage des résidus à l'air libre, tel qu'entendu au départ. Il faudrait vérifier si l'hydrolyse enzymatique des résidus serait plus complète et facile si celle-ci était effectuée avant l'extraction de la lignine plutôt qu'après. Il pourrait alors être avantageux d'utiliser un résidu frais et humide, même avec un fort contenu en lignine, plutôt qu'un résidu délignifié mais sec.

4.5 Fermentation des hydrolysats enzymatiques des oligosaccharides présents dans les filtrats (concentrés de sucres solubles)

Tel qu'expliqué à la section 4.3, ces hydrolysats enzymatiques des oligosaccharides obtenus après prétraitement des résidus et extraction à l'eau chaude, ne contenaient à peu près que du xylose comme sucre soluble. L'évaluation de la fermentescibilité de ces hydrolysats fut donc faite avec la levure Pachysolen tannophilus, le seul des trois microorganismes préalablement évalués (Tableau VIII) capable de fermenter le xylose. Les résultats de ces tests de fermentescibilité sont présentés dans les Tableaux IX à XI. Les observations suivantes furent faites:

CRIQ

. les résultats obtenus avec les hydrolysats nos 1 et 2 (Tableaux IX et X) démontrèrent que l'utilisation, par P. tannophilus, du xylose présent dans les hydrolysats était dépendante de l'agitation fournie, donc de l'aération. Ainsi, l'utilisation du xylose fut améliorée en passant d'une agitation de 125 rpm à une agitation de 150 rpm. Cependant, ceci n'était pas vrai pour l'utilisation du xylose présent dans les fermentations contrôles. Cette différence est probablement reliée à la composition différente des bouillons de fermentation;

. dans tous les cas, la production d'éthanol par P. tannophilus, à partir du xylose présent dans les hydrolysats, fut très faible (Tableaux X et XI). Le degré d'utilisation du xylose varia avec la nature de chacun des hydrolysats, étant de 17% avec l'hydrolysat no 2 et de 100% avec l'hydrolysat no 4. La levure P. tannophilus n'eut pourtant aucune peine à utiliser complètement tout le xylose présent dans les fermentations contrôles et à produire des quantités appréciables d'éthanol (environ 0,23 g d'éthanol/g de xylose consommé). Cette production d'éthanol est au moins équivalente à des valeurs rapportées par d'autres chercheurs (Mahmourides et al., 1985; Maleszka et Schneider, 1982; Jeffries et al., 1985);

. la très faible production d'éthanol à partir du xylose présent dans les hydrolysats semblaient indiquer que les hydrolysats pouvaient contenir un ou plusieurs inhibiteur(s) de la fermentation des sucres en éthanol. Toutefois, le glucose (4%, p/v) ajouté à chacun des hydrolysats fut facilement

CRIQ

fermenté pour donner des concentrations très acceptables en éthanol (1,6 à 1,8%, p/v). Les bons résultats obtenus avec le glucose indiquaient que les hydrolysats contenaient un ou plusieurs facteur(s) inhibant spécifiquement la conversion du xylose des hydrolysats en éthanol et pouvant ausi affecter la consommation de ce xylose; le glucose présent ou ajouté aux hydrolysats n'était pas affecté;

- les résultats d'une expérience préliminaire, dont les résultats ne furent pas rapportées dans ce document, suggérèrent fortement que l'utilisation du xylose et la production d'éthanol à partir du xylose étaient fortement inhibés par un ou plusieurs facteur(s) présent(s) dans le mélange Celluclast (cellulases) + tampon utilisé dans la préparation des hydrolysats. Faute de temps et de budger, nous n'avons pu malheureusement poursuivre ces travaux.

Nous pensons que la fermentation du xylose des hydrolysats en éthanol pourrait être grandement améliorée et à cet effet faisons les deux recommandations suivantes:

- recommandation no 5: rechercher les conditions d'aération optimales pourla conversion du xylose des hydrolysats en éthanol par P. tannophilus. Ces travaux pourraient améliorer rapideent les rendements en éthanol;

- recommandation no 6: examiner l'influence possible du mélange Cellulast + tampon sur l'utilisation du xylose et la production d'éthanol par P. tannophilus. Ces travaux pourraient conduire à

CRIQ

l'identification d'un ou de plusieurs inhibiteur(s) présent(s) dans ce mélange affectant la conversion du xylose en éthanol. Par ricochet, l'identification de ce(s) inhibiteur(s) pourrait permettre d'améliorer grandement la conversion du xylose en éthanol en nous permettant d'éliminer spécifiquement ce(s) inhibiteur(s) des hydrolysats. Nous considérons cette dernière recommandation comme très importante.

4.6 Fermentation des hydrolysats enzymatiques dérivés des résidus prétraités

La préparation de ces hydrolysats enzymatiques riches en glucose, à partir des résidus prétraités et délignifiés, fut discutée plus tôt (section 4.4). L'évaluation de la fermentescibilité de ces hydrolysats fut faite en employant la levure Saccharomyces cerevisiae. Nous aurions pu aussi effectuer ces tests avec la levure P. tannophilus ou la bactérie Zymomonas mobilis mais nous étions limités par les faibles quantités d'hydrolysats disponibles et aussi par les facteurs temps et budget. Nosu avons donc sélectionné le microorganisme le plus connu des trois, soit Sacccharomyces cerevisiae. Les résultats de ces travaux sont présentés dans les Tableaux XII et XIII. Les observations suivantes furent faites:

. parmi les quatre hydrolysats testés, seul l'hydrolysat no 1 ne fut que partiellement fermenté. Seulement 29% du glucose (concentration: 1,94%, p/v) présent dans cet hydrolysat avait été utilisé après 120 heures. La production d'éthanol fut donc faible

CRIQ

mais le rendement théorique en éthanol était quand même excellent (95,1% du rendement théorique). Cet hydrolysat souffrait donc d'un problème d'utilisation du glucose et il est très probable que l'hydrolysat contenait un ou plusieurs inhibiteur(s);

. le glucose présent dans les trois autres hydrolysats (hydrolysats nos 2 à 4) fut totalement utilisé par S. cerevisiae pour donner des quantités appréciables d'éthanol. Le pourcentage du rendement théorique en éthanol atteint fut respectivement 64,5%, 58,8% et 74,7% avec les hydrolysats nos 2, 3 et 4. Ces rendement étaient aussi bons que ceux obtenus dans les fermentations contrôles (glucose 2%);

. malgré les rendements intéressants en éthanol obtenus avec les hydrolysats nos 2 à 4, les taux de production d'éthanol observés avec ces hydrolysats étaient moindres que ceux des fermentations contrôles, suggérant que ces hydrolysats contenaient une concentration limitée d'un ou de plusieurs inhibiteur(s) de la fermentation. Cette conclusion est aussi supportée par le fait que le glucose ajouté aux hydrolysats nos 3 et 4 ne fut que partiellement fermenté.

CRIQ

5.0 CONCLUSION GÉNÉRALE

L'utilisation de la biomasse forestière comme source de substrats pour des fermentations industrielles, ou d'autres procédés biotechnologiques, représente un très grand défi technologique. Le bois est un substrat très difficile. Malgré cela, nous avons pu préparer assez facilement des hydrolysats riches en xylose qui pourraient servir comme substrats dans certaines fermentations. Ces hydrolysats contenaient un ou plusieurs inhibiteur(s) de la conversion du xylose en éthanol par P. tannophilus. Il est possible que ce(s) inhibiteur(s) origine(nt) du mélange Celluclast + tampon, un point qu'il faudra vérifier à nouveau dans l'avenir. Nous avons pu aussi effectuer une hydrolyse enzymatique appréciable des différents bois prétraités, après délignification, et ainsi obtenir des hydrolysats riches en glucose. Trois des quatre hydrolysats ainsi obtenus se sont avérés assez facilement fermentescibles, employant la levure Saccharomyces cerevisiae, pour donner des rendements appréciables en éthanol. Nos travaux démontrent qu'il est possible d'obtenir par voie enzymatique des "sirops" de xylose et de glucose à partir de bois prétraités. Il reste à optimiser et raffiner le procédé afin de préparer des "sirops" de sucres de meilleure qualité et de façon plus économique.

CRIQ

6.0 RÉFÉRENCES

JEFFRIES, T.W., J.H. Fady, et E.N. Lighfoot. Effect of glucose suplements on the fermentation of xylose bu Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Bioeng. 27: 171-176. 1985.

MAHMOURIDES, G., H. Lee, N. Maki, et H. Schneider. Ethanol accumulation in cultures of Pachysolen tannophilus on D-xylose is associated with a transition to a state of low oxygen consumption. Biotechnology, page 59, janvier 1985.

MALESZKA, R., et H. Schneider. Fermentation of D-xylose, xylitol, and D-xylulose by yeasts. Can. J. Microbiol., 28: 360-363, 1982.

CRIQ

ANNEXE "A"

MÉTHODES D'ANALYSE

CRIQ

A.1 Analyse des sucres solubles par chromatographie liquide sous haute pression ("HPLC")

Appareillage: Chromatographe WATERS comprenant les composantes majeures suivantes:

- injecteur automatique WISP 710B;
- chauffe-colonne;
- pompe modèle 510;
- réfractomètre modèle R401;
- intégrateur modèle 730;
- contrôleur de système modèle 721.

Colonne: Aminex HPX-87P (plomb) de Bio-Rad Labs. Une précolonne appropriée fut aussi utilisée afin de ne pas trop contaminer la colonne.

Elvant: Eau doublement distillée, filtrée et dégazée dans le système Milli-Q de Waters.

Conditions de chromatographie:

- débit 0,5 mL/min;
- T°: 85° C;
- vitesse d'enregistrement du papier: 0,2 cm/min;
- volume injecté: généralement 5-10 L.

Calibration: Méthode du standard externe (employant un mélange de sucres et d'alcools): voir Figure A.1.

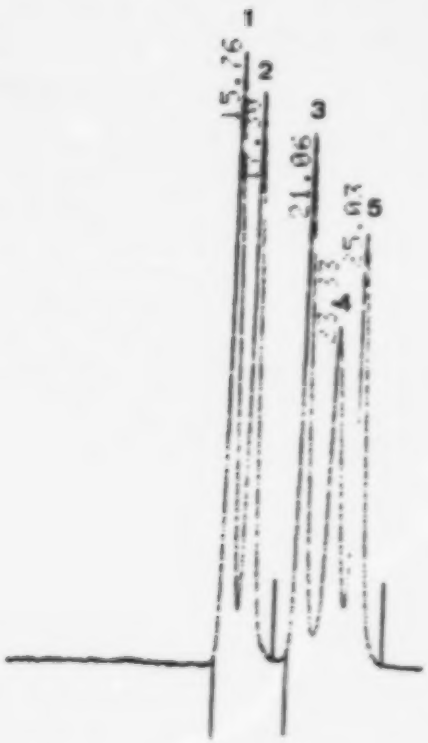


Figure A.1: Séparation d'un mélange standard de sucres et d'alcools par chromatographie liquide sous haute pression ("HPLC"). Noter particulièrmenet la très bonne séparation entre le glucose et le xylose.

CRIQ

A.2 Analyse des sucres réducteurs

Méthode: Réactif DNS ("3,5-dinitrosalicylic acid") tel que préparé par Fischer et Kohtès (Helvetica Chimica Acta, 34: 1123-1131, 1951).

Procédure:

a) Volume d'échantillon: 1,5 mL.

b) Ajouter 3,0 mL du réactif DNS - bien mélanger.

c) Faire bouillir 5 minutes (à partir du début de l'ébullition).

d) Refroidir 5 minutes dans l'eau froide.

e) Ajouter 8 mL d'eau distillée (pour dilution de la couleur) et mélanger très soigneusement sur "Vortex".

f) Lire l'absorbance à λ = 560 nm contre de l'eau distillée;

f) Courbe standard: 0-3 mg de glucose ou xylose (fait aussi dans tampon).

Sensibilité de la méthode: 0,27-0,28 unités d'absorbance à 560 nm pour 1 mg de glucose.

CRIQ

A.3 Détermination de l'activité "Filter Paperase"

La détermination de l'activité cellulasique (ici "Filter Paperase") des préparations d'enzyme Celluclast 1,5 mL (NOVO) employées dans nos travaux fut faite tel que décrit par Mandels et al. (Biotechnol. Bioeng. Symp. 6: 21-33, 1976; voir Figure 3 de cette référence). Deux changements mineurs furent effectués:

a) 8 mL d'eau distillée plutôt que 16 mL furent ajoutés à chaque tube après l'étape d'ébullition;

b) l'absorbance fut mesurée à 560 nm plutôt qu'à 550 nm.

La quantité de glucose produite par l'enzyme fut déterminée à partir d'une courbe standard (0 à 3 mg de glucose dans tampon).

A.4 Détermination de l'éthanol par chromatographie en phase gazeuse

L'éthanol produit durant les tests de fermentescibilité fut mesuré dans un chromatographe à gas de marque Varian (modèle 3400) équipé d'un détecteur à flamme ionisante.

Colonne:	Chromosorb 101 (6 pi x 1/8 po, acier inoxydable)
Températures:	injecteur: 200° C; colonne: 150° C; détecteur: 250° C.
Gaz porteur:	hélium, 80 lb/po^2 débit 45 mL/min.
Gaz de combustion:	air, 60 lb/po^2 hydrogène, 40 lb/po^2
Intégrateur:	modèle 3390A de Hewlett-Packard
Standard interne:	acétone.

CRIQ

ANNEXE "B"

PROTOCOLES SUIVIS POUR L'EXTRACTION
DE LA LIGNINE ET LES HYDROLYSES ENZYMATIQUES

B.1 Extraction de la lignine

L'extraction de la lignine à partir des divers résidus fut faite en deux étapes, comme suit;

Première étape:

a) Décongeler les résidus (fibres) obtenus après l'extraction des sucres solubles par l'eau chaude dans les appareils Soxhlet avec recirculation.

b) Dans un ballon en verre de 5 L, ajouter:
   - 200 g de résidu humide;
   - 1800 mL d'éthanol à 95%;
   - 200 mL de HCl 2N.

c) Chauffer avec reflux pendant 12 heures (voir Figure 9 pour photo du montage employé pour cette extraction). Des pierres ou billes à ébullition sont ajoutées afin de "stabiliser" l'ébullition.

d) Refroidir. Filtrer sur filtre de cellulose Whatman no 1 sous vide partiel. Le filtrat (brun foncé) est gardé à 4° C pendant quelques jours puis congelé.

B.1 Extraction de la lignine

Deuxième étape: a) Le résidus sec obtenu après la première extraction de la lignine fut traité une seconde fois exactement tel que décrit pour la première étape sauf que la quantité de résidu traitée à chaque fois fut augmentée par 50-60%. Cette deuxième extraction a permis d'extraire une plus grande quantité de lignine et ainsi d'obtenir un résidu plus pâle.

Concentration des extraits:

Les extraits de lignine obtenus après les deux extractions furent combinés, concentrés à 65° C sous vide partiel dans un "Rotovapor" Büchi (voir Figure 4) et les concentrés placés au congélateur.

B.2 Hydrolyse enzymatiques des oligosaccharides présents dans les concentrés de sucres solubles extraits des différents bois prétraités

Référence: Section 3.7 de ce rapport.

Pour chacun des quatre concentrés en notre possession, l'hydrolyse enzymatique des oligosaccharides fut effectuée comme suit:

a) à une série de fioles Erlenmeyer de 500 mL, ajouter:
   . 250 mL de concentré;
   . 25 mL de tampon citrate (0,5 M) pH 4,8 (ne contenant pas d'azoture de sodiumn: NaN_3);
   . 14 mL d'eau distillée;

b) la réaction enzymatique fut initiée par l'ajout de 14 mL de la préparation enzymatique Celluclast 1,5 L de NOVO (activité "Filter Paperase" mesurée: 28,5 unités/mL). Immédiatement après l'ajout d'enzymes et mélange de la solution, 5 mL du mélange furent soutirés d'une des fioles et placés dans l'eau bouillante pendant 15 minutes afin d'inactiver les enzymes et ainsi obtenir un échantillon à T= 0 heure;

c) incuber les fioles à 50° C avec agitation (150 rpm) dans un incubateur Psychrotherm (New Brunswick Sci.). Les fioles furent couvertes par du papier d'aluminium;

d) après 24 heures d'hydrolyse, le contenu des fioles fut combiné et 5 mL de ce mélange furent soutirés et bouillis pendant 15 minutes afin d'inactiver les enzymes. Le reste de l'hydrolysat fut alors congelé pour des études ultérieures de fermentation;

e) les deux échantillons bouillis (T= 0 h et T= 24 h) furent d'abord centrifugés afin d'éliminer le précipité présent; la fraction liquide fut ensuite récupérée et analysée par "HPLC".

B.3 Hydrolyse enzymatique des résidus

Référence: section 3.6.2 à 3.6.4

Pour chacun des quatre résidus en notre possession, l'hydrolyse enzymatique des fibres fut faite en deux étapes, comme suit:

Première étape: a) A une série de fioles Erlenmeyer de 500 mL, ajouter:

- 6 g de résidu sec (après broyage à la main dans un mortier de céramique;
- 31,7 mL de tampon citrate (0,5 M) pH 4,8 (ne contenant pas d'azoture de sodium: NaN_3);
- 285 mL d'eau distillée;
- 16,5 mL de la préparation cellulasique Celluclast 1,5 L (NOVO) (28,5 unités FPase/mL);
- 0,3 mL de cellobiase Novozym 188;

b) incuber à 50° C (180 rpm) dans incubateur Psychrotherm (New Brunswick Sci.); les fioles furent couvertes de papier d'aluminium;

CRIQ

c) après 60 heures d'hydrolyse, centrifuger les mélanges réactionnels à 3500 rpm pendant 20 minutes dans un centrifugeuse IEC DPR-6000 employant des bouteilles en Nalgène de 1 L; chaque bouteille contenait un volume connu de mélange réactionnel;

d) le surnageant est soigneusement récupéré et congelé. Le résidu est alors soumis à une deuxième hydrolyse enzymatique.

Deuxième étape: a) le résidu au fond de chaque bouteille est ensuite resuspendu dans un volume de mélange réactionnel (tampon + eau + enzymes) équivalent à celui avant centrifugation. Après resuspension, le contenu de chaque bouteille fut divisé en parties égales d'environ 330 mL, lesquelles furent placées dans des fioles Erlenmeyer de 500 mL et incubées à 50° C (comme ci-haut) afin d'effectuer une seconde étape d'hydrolyse enzymatique pendant 60 heures;

c) suivant cette deuxième hydrolyse, la fraction liquide fut récupérée par centrifugation (voir première étape) et combinée à celle obtenue lors de la première hydrolyse. Cette fraction liquide fut alors concentrée sous vide partiel tel que décrit à la section 3.6.3;

d) les résidus obtenus après la double hydrolyse enzymatique furent traités tel que rapporté dans la section 3.6.4.

Note importante: L'efficacité des enzymes utilisées dans ces travaux d'hydrolyse fut vérifiée en effectuant parallèlement l'hydrolyse d'une cellulose hautement purifiée, la cellulose "Solka-Floc SW40" (James River Corp.).

ANNEXE "C"

TRAVAUX DE FERMENTATION:

milieux de culture
conditions de croissance
préparation des inoculums
fermentation des sucres purs

CRIQ

C.1 Milieux de culture

C.1.1 Milieu pour Z. mobilis

Substance	Quantité/1000 mL
Glucose et/ou xylose	20-40 g
Extrait de levure	10 g
Bacto-peptone	20 g
Eau distillée	1000 mL
Stériliser à l'autoclave:	121° C (15-20 min)

C.1.2 Milieu pour S. cerevisiae et P. tannophilus

Substance	Quantité/1000 mL
Glucose et/ou xylose	20-40 g
Solution minérale (10X)*	100 mL
Eau distillée	800 mL

a) Stériliser le bouillon de base à l'autoclave (121° C - 20 minutes).

b) Immédiatement avant l'utilisation de ce bouillon, ajouter 10 mL d'une solution stérile de "Yeast Nitrogen Base" à 6,7% (p/v) pour chaque 90 mL de bouillon (cette solution fut stérilisée par filtration). Le bouillon est alors complet et prêt pour l'inoculation.

---

*: Solution minérale 10X: La composition de cette solution minérale concentrée (10X) est décrite à la page suivante (Tableau C.1). Celle-ci est identique à celle publiée par Maiorella et al. (1981) (Adv. in Biochem. Eng. 20: 43-) sauf que l'acide benzoïque remplaçait l'acide p-aminobenzoïque.

CRIQ

TABLEAU C.1

COMPOSITION DE LA SOLUTION MINÉRALE CONCENTRÉE 10X EMPLOYÉE POUR LA CROISSANCE DE S. CEREVISIAE ET P. TANNOPHILUS

SUBSTANCE	QUANTITÉ/1000 mL (g)
$(NH_4)_2SO_4$	51,9
KH_2PO_4	15,3
$MgSO_4.7H_2O$	5,5
$CaCl_2.2H_2O$	1,3
H_3BO_3	0,1
$CoSO_4.7H_2O$	0,01
$CuSO_4.5H_2O$	0,04
$ZnSO_4.7H_2O$	0,1
$MnSO_4.H_2O$	0,03
KI	0,01
$FeSO_4.7H_2O$	0,02
$Al_2(SO_4)_3.(14-18)H_2O$	0,03
Biotine	0,00125
Pantothénate de calcium	0,0625
Inositol	1,25
Thiamine	0,05
Pyridoxine	0,0625
Acide benzoïque	0,01
Acide nicotinique	0,05

CRIQ

C.2 Croissance de Z. mobilis et préparation des inoculums

Les inoculums de Z. mobilis ATCC 10988 requis pour les études de fermentation furent préparés à partir d'une culture lyophilisée, comme suit:

a) la culture lyophilisée fut d'abord resuspendue dans 1,5 mL de bouillon glucose 2% (section C.1.1) et 0,5 mL de cette suspension transféré dans chacune des deux fioles Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL du même bouillon (bouchon-éponge). Incubation statique à 28° C pendant 6 jours: une croissance acceptable fut obtenue;

b) employant l'une des deux fioles en (a) comme source d'inoculum, dix (10) géloses inclinées (milieu glucose 2%, gélose 1,5%) furent inoculées avec 0,25 mL de la suspension. Incubation des géloses à 28° C dans une jarre anaérobie "Gas Pak (BBL)" pendant sept jours;

c) des fioles Erlenmeyer de 250 mL (bouchon-éponge) contenant 150 mL de l'un des trois bouillons suivants:

- glucose 4%;
- xylose 4%;
- glucose 2% + xylose 2%;

furent ensuite inoculées à partir des géloses inclinées obtenus en (b) à raison d'une gélose pour deux fioles. Les fioles ainsi inoculées furent alors incubées dans des conditions semi-anaérobies (30° C, 100-100 rpm dans incubateur G25 de New Brunswick Sci.). Après 68-70 heures de croissance, le contenu de ces fioles servit d'inoculum pour les fermentations de sucres purs en petits fermenteurs (voir ci-après).

CRIQ

C.3 Fermentation des sucres purs avec Z. mobilis

Ces fermentations de sucres purs furent faites dans trois petits fermenteurs "Multigen" de capacité 2 L (New Brunswick Sci.) tel que démontré la Figure 19. Chaque fermenteur contenait environ 1500 mL (après inoculation) de l'un des trois bouillons suivants:

- glucose 4%;
- xylose 4%;
- glucose 2% + xylose 2%;

(voir section C.1.1 pour compostion du milieu).

La préparation des divers bouillons et l'inoculation furent faites comme suit:

a) le bouillon de base (tout sauf le sucre) fut d'abord préparé et stérilisé. Les quantités d'extrait de levure et de "Bacto-peptone" requises pour 1500 mL de bouillon furent d'abord dissoutes dans 850 mL d'eau distillée, ces solutions transférées dans les jarres de verre (2 L) des fermenteurs ("Multigen"), et stérilisées à l'autoclave (121° C - 20 minutes);

b) peu avant le début des fermentations, les quantités de sucre(s) requises pour 1500 mL de bouillon furent dissoutes dans 500 mL d'eau distillée et ces solutions stérilisées par filtration sur membrane Millipore (0,45 µm). Ces solutions furent ensuite ajoutées au bouillon de base pour donner le bouillon complet, prêt à être inoculé;

c) les fermenteurs, contenant chacun 1350 mL de bouillon, furent finalement inoculés par l'ajout d'environ 150 mL d'un inoculum préparé exactement dans le même milieu (même substrat). La préparation de ces inoculums fut décrite dans la section C.2. Chaque fermenteur contenait donc environ 1500 mL de milieu après inoculation. Les conditions de fermentation sont décrites aux Figures 25 et 26 et dans la section 3.8.1.3.

C.4 Croissance de S. cerevisiae et préparation des inoculums

Les inoculums de S. cerevisiae no 1116 requis pour les travaux de fermentation furent préparés à partir de géloses inclinées (1,5% gélose) employant le milieu de culture décrit à la section C.1.2. Ceci fut effectué comme suit:

. des fioles Erlenmeyer de 250 mL (bouchon-éponge) contenant 150 mL (après addition du "YNB") des bouillons suivants:

a) glucose 4%;
b) xylose 4%;
c) glucose 2% + xylose 2%;

furent d'abord inoculées à partir de géloses inclinées (glucose) de S. cerevisiae (1 gélose inclinée/2 fioles inoculées). Ces fioles furent incubées à

CRIQ

28° C pendant 72 heures dans un incubateur G25 (New Brunswick Sci.) avec une agitation de 150 rpm, sauf pour le bouillon xylose 4% où une agitation de 250 rpm fut employée (plus grande aération) afin de favoriser le métabolisme du xylose. Après 72 heures, la croissance de S. cerevisiae était très bonne dans toutes les fioles sauf dans celles contenant le bouillon xylose 4% où la croissance était faible. Le contenu de ces fioles servit d'inoculum pour les fermentations de sucres purs en petits fermenteurs.

C.5 Fermentation des sucres purs avec S. cerevisiae

Fermenteurs: 3 petits fermenteurs "Multigen"

Bouillons fermentés:
- glucose 4%
- xylose 4%
- glucose 2 % + xylose 2%

(voir section C.1.2 pour composition du milieu)

Préparations des bouillons et inoculation:

a) le bouillon de base (tout sauf le "YNB) fut d'abord préparé et pasteurisé. Les quantités de sucre(s) et de solution minérale (10X) requises pour 1500 mL de bouillon furent d'abord "dissoutes" dans un volume de 1250 mL. Ce bouillon de base fut ensuite versé dans chacun des fermenteurs et pasteurisé à 85° C pendant 30 minutes. Notons que les fermenteurs vides avaient déjà été stérilisés à l'autoclave (121° C - 15 minutes) avant cette pasteurisation;

b) avant le début des fermentations, le bouillon fut complété par l'ajout de 100 mL d'une solution stérile de 10% "YNB" (stérilisation par filtration). Chaque jarre contenait donc 1350 mL d'un bouillon complet, prêt à être inoculé;

c) les fermenteurs furent finalement inoculés par l'ajout de 150 mL d'un inoculum préparé exactement dans le même milieu (même substrat) tel que décrit à la section C.1.2 (volume total dans chaque fermenteur: environ 1500 mL). Les conditions de fermentation sont décrites aux Figures 23 et 24 et dans la section 3.8.1.2.

C.6 Croissance de P. tannophilus, préparation des inoculums et fermentation des sucres purs

La souche P. tannophilus ATCC 32691 fut employée pour ces travaux. Tout fut fait essentiellement tel que décrit plus tôt pour S. cerevisiae dans les sections C.4 et C.5. Les conditions de fermentation employées sont décrites aux Figures 20 à 22 et dans la section 3.8.1.1.